



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
TEHNOLOŠKI FAKULTET NOVI SAD  
Tehnološko inženjerstvo

**DEFINISANJE LIPOFILNOSTI,  
FARMAKOKINETIČKIH PARAMETARA I  
ANTI-KANCEROGENOG POTENCIJALA  
NOVOSINTETISANE SERIJE STIRIL LAKTONA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:

Dr Lidija Jevrić, vanredni profesor

Kandidat:

Davor Lončar, dipl. inž. tehnol.

Novi Sad, 2018. godine

**UNIVERZITET U NOVOM SADU  
TEHNOLŠKI FAKULTET NOVI SAD**

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	
Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada: VR	Doktorska disertacija
Autor: AU	Davor M. Lončar, dipl. inž. tehnol.
Mentor/ko-mentor: MN	Dr Lidija Jevrić, vanredni profesor
Naslov rada: NR	Definisanje lipofilnosti, farmakokinetičkih parametara i antikancerogenog potencijala novosintetisane serije stiril laktona
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	Srpski/Engleski
Zemlja publikacije: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2018
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MS	Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Srbija
Fizički opis rada: FO	(pogl./strana/literaturni navodi/tabela/slika-grafika/shema) 7 163 252 29 77 1
Naučna oblast: OB	Tehnološko inženjerstvo
Naučna disciplina: DI	Primenjena hemija, Analitička hemija
Predmetna odrednica/ključne reči: PO	Stiril laktoni, lipofilnost, QSRR, farmakokinetika, QSPKR, citotoksičnost, SAR, molekulski doking, QSAR, 3D-QSAR
UDK	

Čuva se: ČU	U biblioteci Tehnološkog fakulteta Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Srbija
Važna napomena: VN	/
Izvod: IZ Reverzno-faznom tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom primenom dva sistema rastvarača ispitano je ponašanje i hromatografska lipofilnost prirodnih stiril laktona 7-(+)-goniofufurona, 7- <i>epi</i> -(+)-goniofufurona, krasalaktona B i C i dvadeset njihovih novosintetizovanih derivata i analoga. U ranijim ispitivanjima pokazalo se da ova jedinjenja imaju veliki biološki potencijal jer pokazuju zapaženu citotoksičnost prema više humanih tumorskih ćelijskih linija. Hromatografsko ponašanje jedinjenja uglavnom je u skladu sa njihovom strukturom. Ustanovljene su linearne veze između hromatografskih retencionih konstanti i većine <i>in silico</i> parametara lipofilnosti. Primenom hemometrijske QSRR analize utvrđeni su veoma dobri multi linearni regresioni prediktivni modeli kvantitativne zavisnosti između eksperimentalno dobijene hromatografske retencione konstante, koja definiše retenciju jedinjenja u čistoj vodi i <i>in silico</i> molekulskih deskriptora odnosno strukture jedinjenja. Lipofilnost jedinjenja ima najveći uticaj na njihove farmakokinetičke, tj. ADME (apsorpcija, distribucija, metabolizam, eliminacija) osobine. Definisani su i statistički potvrđeni najbolji multi linearni regresioni modeli zavisnosti farmakokinetičkih parametara stiril laktona i od drugih molekulskih deskriptora. <i>In vitro</i> citotoksična aktivnost jedinjenja evaluirana je prema četiri nove humane maligne ćelijske linije: kancer prostate (PC3), kancer debelog creva (HT-29), melanom (Hs294T), adenokancer pluća (A549). Najaktivnije novosintetizovano jedinjenje je triciklični 4-fluorocinamatni analog, koji ispoljava nanomolarnu aktivnost (IC <sub>50</sub> 2,1 nM) prema ćelijama melanoma i aktivniji je preko 2250 puta od komercijalnog antitumorskog agensa doksorubicina (DOX). SAR analizom utvrđena je zavisnost između strukture i biološke aktivnosti jedinjenja. Molekulskim dokingom ispitana je veza stiril laktona i ciljanog proteina značajnog za kancer prostate. Jedinjenja sa visokom inhibitornom aktivnošću prema ćelijama kancera prostate imaju visok doking skor i mogu graditi koordinativno-kovalentnu vezu sa Fe <sup>2+</sup> jonom prisutnim u aktivnom centru enzima. 3D-QSAR analizom, koja je izvedena metodama komparativnih polja CoMFA i CoMSIA, formiran je značajan prediktivni model između hemijske strukture i biološke aktivnosti stiril laktona.	
Datum prihvatanja teme od strane Senata Univerziteta DP	22. 06. 2017.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: KO <i>Predsednik:</i> Dr Biljana Škrbić, redovni profesor Tehnološkog fakulteta Novi Sad, Univerziteta u Novom Sadu <i>Član – Mentor:</i> Dr Lidija Jevrić, vanredni profesor Tehnološkog fakulteta Novi Sad, Univerziteta u Novom Sadu <i>Član:</i> Dr Velimir Popsavin, dopisni član SANU, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu	

**UNIVERSITY OF NOVI SAD**  
**FACULTY OF TECHNOLOGY NOVI SAD**

KEY WORDS DOCUMENTATION	
Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monographic publication
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	B. Sc. technol. Davor M. Lončar
Mentor: MN	Dr Lidija Jevrić, associate proffesor
Title: TI	Defining of lipophilicity, pharmacokinetic parameters and anticancer potential of newly synthesized series of styryl lactones
Language of text: LT	Serbian (latin)
Language of abstract: LA	Serbian/English
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2018
Publisher: PB	Author's reprint
Publishing place: PP	Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Serbia
Physical description: PD	(chapt./pages/references/tables/figure-graphs/ sheme) 7    163    252    29    77    1
Scientific field: SF	Technology Engineering
Scientific discipline: SD	Applied chemistry, Analytical chemistry
Subject kew words: SKW	Styryl lactones, lipophilicity, QSRR, pharmacokinetic, QSPKR cytotoxicity, SAR, molecular doking, QSAR, 3D-QSAR
UDK	
Holding data: HD	Library of the Faculty of Technology Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Serbia
Note: N	/

**Abstract:****AB**

The behavior and the chromatographic lipophilicity natural styryl lactone 7-(+)-goniofufurone, 7-*epi*-(+)-goniofufurone, crassalactones B and C and twenty of their newly synthesized derivatives and analogs were examined using reverse-phase high performance liquid chromatography in the two solvent systems. In previous studies it has been shown that these compounds have great biological potential toward several human tumor cell lines. Chromatographic behavior of the compounds is generally in accordance with their structure. The relationships between the chromatographic retention constants and the majority of their *in silico* lipophilicity parameters are linear. The application of chemometric QSRR analysis determined very good multiple linear regression predictive models of quantitative correlation between experimentally obtained chromatographic retention constant, which determines the retention of the compound in pure water and *in silico* molecular descriptors, i.e. the structure of the compound. The lipophilicity of the compounds has a major influence on their pharmacokinetics, i.e. ADME (absorption, distribution, metabolism, elimination) properties. The best multi-linear regression models depending on the pharmacokinetic parameters of styryl lactone and other molecular descriptors have been defined and statistically validated. *In vitro* cytotoxic activity of the compounds was evaluated according to four novel human malignant cell lines: prostate cancer (PC3), colon cancer (HT-29), melanoma (Hs294T), lung adenocarcinoma (A549). The most active compound was tricyclic 4-fluorocinnamic analog, which exhibits a nanomolar activity (IC<sub>50</sub> 2,1 nM) toward melanoma cells. This compound is over 2250 times more active than commercial antitumor agent doxorubicin (DOX). SAR analysis has revealed a correlation between the structure and the biological activity of the compounds. Using the molecular docking the relationship of the styryl lactone and the target protein important for prostate cancer was examined. The compounds with high inhibitory activity against prostate cancer cells have a high docking score and are capable to form a coordinative-covalent bond with a Fe<sup>2+</sup> ion present in the active centre of the enzyme. 3D-QSAR analysis, which was performed by methods of comparative CoMFA and CoMSIA fields, has formed a good predictive model between chemical structure and biological activity of the styryl lactone.

Accepted on Senate of  
University:  
AS

22. 06. 2017.

Defended on:  
DE

Thesis defend board:

DB

*President:*

Dr Biljana Škrbić, full professor at the Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad

*Member – Mentor:*

Dr Lidija Jevrić, associate professor at the Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad

*Member:*

Dr Velimir Popsavin, corresponding member of the Serbian Academy of Science, and Arts, full professor at the Faculty of Sciences, University of Novi Sad

*Ova doktorska disertacija urađena je u laboratoriji za analitičku hemiju Tehnološkog fakulteta Novi Sad, Univerziteta u Novom Sadu pod mentorstvom prof. dr Lidije Jevrić, kojoj se najiskrenije zahvaljujem na osmišljavanju i svesrdnoj pomoći u realizaciji ovog rada.*

*Istraživanja su izvedena sa sintetizovanim prirodnim i novosintetizovanim stiril laktonima, koji su dobijeni u laboratoriji za bioorgansku i medicinsku hemiju, Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu. Neizmernu zahvalnost izražavam prof. dr Velimiru Popsavinu, dopisnom članu SANU i njegovoj ekipi dr Mirjani Popsavin, dr Goranu Benedekoviću, dr Ivani Kovačević i dr Jovani Francuz, koji su mi omogućili da koristim supstance primenjene u realizaciji disertacije.*

*Dr Vesni Kojić iz Instituta za onkologiju Vojvodine srdačno se zahvaljujem na pomoći pri određivanju antiproliferativne aktivnosti ispitivanih jedinjenja.*

*Veliku zahvalnost upućujem prof. dr Biljani Škrbić na interesovanju i podršci tokom rada.*

*Zahvaljujem se prof. dr Sanji Podunavac-Kuzmanović, koja je svojim odlučnim stavom i angažovanjem omogućila završne korake u realizaciji ovog rada. Takođe, njeni saveti su bili dragoceni tokom pregledanja rada i svih materijala vezanih za završetak rada.*

*Dr Milici Karadžić, istraživaču saradniku na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije i dr Strahinji Kovačević, asistentu Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu dugujem iskrenu zahvalnost za pomoć u obradi rezultata i postavljanju QSRR modela.*

*Posebno sam zahvalan dr Dajani Vukić i dr Vladimiru Vukiću, naučnim saradnicima Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, koji su svojim angažovanjem vezanim za 3D-QSAR analizu i molekulski doking doprineli potpunijoj evaluaciji rezultata disertacije.*

*Dr Nataši Milošević sa Departmana za farmaciju Medicinskog fakulteta Novi Sad iskreno se zahvaljujem za upućivanje u farmakokinetiku ispitivanih jedinjenja.*

*Zahvalnost upućujem i John Milanu van der Berghu, mast. inž. tehnol., Suzani Anđelković, Branislavu Bastaji i Saši Vuliću za tehničku pomoć u oblikovanju ovog rada.*

*Veliku zahvalnost izražavam mojim roditeljima i bratu na razumevanju, podršci i svemu što su učinili za mene do sada.*

*Davor Lončar*

## IZVOD

Reverzno-faznom tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom primenom dva sistema rastvarača ispitano je ponašanje i hromatografska lipofilnost prirodnih stiril laktona 7-(+)-goniofufurona, 7-*epi*-(+)-goniofufurona, krasalaktona B i C i dvadeset njihovih novosintetizovanih derivata i analoga. U ranijim ispitivanjima pokazalo se da ova jedinjenja imaju značajan antineoplastični potencijal prema ćelijskim linijama više humanih tumora. Hromatografsko ponašanje jedinjenja uglavnom je u skladu sa njihovom strukturom. Ustanovljene su linearne veze između hromatografskih retencionih konstanti i većine *in silico* parametara lipofilnosti. Primenom hemometrijske QSRR analize utvrđeni su veoma dobri multi linearni prediktivni modeli kvantitativne zavisnosti između eksperimentalno dobijene hromatografske retencione konstante, koja definiše retenciju jedinjenja u čistoj vodi i *in silico* molekulskih deskriptora odnosno strukture jedinjenja. Lipofilnost jedinjenja ima najveći uticaj na njihove farmakokinetičke, tj. ADME (apsorpcija, distribucija, metabolizam, eliminacija) osobine. Definisani su i statistički potvrđeni najbolji multi linearni regresioni modeli zavisnosti farmakokinetičkih parametara stiril laktona i od drugih molekulskih deskriptora. *In vitro* citotoksična aktivnost jedinjenja ispitana je prema četiri dodatne humane maligne ćelijske linije: kancer prostate (PC3), kancer kolona (HT-29), melanom (Hs294T) i adenokarcinom pluća (A549). Najaktivnije novosintetizovano jedinjenje je triciklični 4-fluorocinamatni analog, koji ispoljava nanomolarnu aktivnost ( $IC_{50}$  2,1 nM) prema ćelijama melanoma i preko 2250 puta je aktivniji od komercijalnog antitumorskog agensa doksorubicina (DOX). SAR analizom uspostavljena je korelacija između strukture i antitumorske aktivnosti ispitivanih jedinjenja. Molekulskim dokingom ispitana je veza stiril laktona i ciljanog enzima značajnog za rast kancera prostate. Jedinjenja sa visokom inhibitornom aktivnošću prema ćelijama kancera prostate imaju visok doking skor i mogu da grade koordinativno-kovalentnu vezu sa  $Fe^{2+}$  jonom prisutnim u aktivnom centru enzima. 3D-QSAR analizom, koja je izvedena metodama komparativnih polja CoMFA i CoMSIA, formiran je dobar prediktivni model između hemijske strukture i biološke aktivnosti stiril laktona.

**Ključne reči:** stiril laktoni, hromatografska lipofilnost, QSRR analiza, farmakokinetika, citotoksična aktivnost, SAR analiza, molekulski doking, QSAR analiza, 3D-QSAR analiza

## ABSTRACT

The behavior and the chromatographic lipophilicity natural styryl lactone 7-(+)-goniofufurone, 7-*epi*-(+)-goniofufurone, crassalactones B and C and twenty a number of their newly synthesized derivatives and analogs were examined using reverse-phase high performance liquid chromatography in two solvent systems. In previous studies it has been shown that these compounds have great biological potential toward several human tumor cell lines. Chromatographic behavior of compounds is generally an consequence their structure. The relationships between the chromatographic retention constants and the majority of the *in silico* lipophilicity parameters are linear. The application of chemometric QSRR analysis determined very good multilinear predictive models of quantitative correlation between experimentally obtained chromatographic retention constant, which determines the retention of the compound in pure water and *in silico* molecular descriptors, i.e. the structure of the compound. The lipophilicity of compounds has a major influence on their pharmacokinetics, i.e. ADME (absorption, distribution, metabolism, elimination) properties. The best multilinear regression models depending on the pharmacokinetic parameters of styryl lactone and other molecular descriptors have been defined and statistically validated. *In vitro* cytotoxic activity of the compounds was evaluated according to four novel human malignant cell lines: prostate cancer (PC3), colon cancer (HT-29), melanoma (Hs294T) and lung adenocarcinoma (A549). The most active synthesized compound was tricyclic 4-fluorocinnamic analog, which exhibits a submicromolar activity (IC<sub>50</sub> 2,1 nM) toward melanoma cells. This compound is over 2250 times more active than the commercial antitumor agent doxorubicin (DOX). SAR analysis has revealed a correlation between structure and antitumor activity of the compounds. By means of molecular docking the relationship styryl lactone and the target enzyme important for development of prostate cancer was examined. The compounds with high inhibitory activity against prostate cancer cells have a high docking scores and are capable to form a coordinative bond with a Fe<sup>2+</sup> ion present in the active site of the enzyme. 3D-QSAR analysis, which was performed by methods of comparative CoMFA and CoMSIA fields, has formed a good predictive model between chemical structure and biological activity of styryl lactones.

**Keywords:** styryl lactones, chromatographic lipophilicity, QSRR analysis, pharmacokinetic, cytotoxic activity, SAR analysis, molecular docking, QSAR analysis, 3D-QSAR



## SPISAK SKRAĆENICA

ACN	– acetonitril
ADMET	– apsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija i toksičnost (eng. <i>Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity</i> )
AUC	– površina ispod krive (eng. <i>Area Under the Curve</i> ) zavisnosti koncentracija jedinjenja u krvi-vreme
BBB	– krvno-moždana barijera (eng. <i>Blood Brain Barrier</i> )
CA	– klaster analiza (eng. <i>Cluster Analysis</i> )
Caco-2	– intestinalna permeabilnost (propustljivost) humanih epitelnih ćelija adenokarcinoma kolona prema ispitivanim jedinjenjima
CHI	– hromatografski indeks lipofilnosti (eng. <i>Chromatographic Hydrophobicity Index</i> )
CoMFA	– komparativna analiza molekulskih polja (eng. <i>Comparative Molecular Field Analysis</i> )
CoMSIA	– komparativna analiza indeksa molekulske sličnosti (eng. <i>Comparative Molecular Similarity Index Analysis</i> )
C18	– oktadecil ugljenični niz
CV	– unakrsna validacija (eng. <i>Cross Validation</i> )
DAD	– <i>Diode Array Detector</i>
DOX	– doksorubicin (komercijalni antitumorski agensi)
F-vrednost	– Fišerov test
HBA	– akceptor vodonične veze (eng. <i>Hydrogen Bonding Acceptors</i> )
HBD	– donori vodonične veze (eng. <i>Hydrogen Bonding Donors</i> )
HCA	– hijerarhijska klaster analiza (eng. <i>Hierarchical Cluster Analysis</i> )
HIA	– humana intestinalna apsorpcija (eng. <i>Human Intestinal Absorption</i> )
HPLC	– tečna hromatografija visokih performansi (pod visokim pritiskom) (eng. <i>High-Performance (Pressure) Liquid Chromatography</i> )
IC	– inhibiciona koncentracija (eng. <i>Inhibition Concentration</i> )
IC <sub>50</sub>	– koncentracija jedinjenja koja inhibira rast 50% ćelija u poređenju sa netretiranom kontrolom
LD	– letalna doza (eng. <i>Letal Dose</i> )
log <sub>k</sub>	– retencioni faktor
log <sub>k<sub>o</sub></sub>	– retencija jedinjenja u čistoj vodi (jednačina 2.5)
LP	– lipoproteini
LR	– linearna regresija (eng. <i>Linear Regression</i> )

MDCK	– propustljivost Madin-Darbi epitelnih ćelija psećeg bubrega prema ispitivanim jedinjenjima (eng. <i>Madin-Darby Canine Kidney</i> )
MeOH	– metanol
MLR	– višestruka (multipla) linearna regresija (eng. <i>Multiple Linear Regression</i> )
MMFF	– MMFF energija (eng. <i>Merck Molecular Force Field</i> )
MW	– molekulska masa (eng. <i>Molecular Weight</i> )
p	– verovatnoća; nivo značajnosti
pIC <sub>50</sub>	– negativni dekadni logaritam IC <sub>50</sub> , $-\log IC_{50}$
pK <sub>a</sub>	– negativni dekadni logaritam konstante kiselosti K <sub>a</sub> , $-\log K_a$
PLS	– analiza parcijalnih najmanjih kvadrata (eng. <i>Partial Least Squares</i> )
PRESS	– suma kvadrata odstupanja od predviđenih vrednosti (eng. <i>Predicted Residual Error Sum Squares</i> )
PSA	– polarna površina (eng. <i>Polar Surface Area</i> )
Q <sup>2</sup>	– cross-validacioni koeficijent (jednačina 3.15)
QSAR	– kvantitativna veza (relacija) između strukture i aktivnosti molekula (eng. <i>Quantitative Structure-Activity Relationships</i> )
3D-QSAR	– trodimenzionalna QSAR analiza
QSPKR	– zavisnost između strukture i farmakokinetičkih osobina molekula (eng. <i>Quantitative Structure-Pharmacokinetic Relationship</i> )
QSPR	– kvantitativna veza između strukture i fizičko-hemijskih osobina molekula (eng. <i>Quantitative Structure-Property Relationships</i> )
QSRR	– kvantitativna veza između strukture i retencije molekula (eng. <i>Quantitative Structure Retention Relationships</i> )
R	– Pirsonov koeficijent korelacije (eng. <i>Pearson's correlation coefficient</i> )
R <sup>2</sup>	– koeficijent determinacije (eng. <i>Squared correlation coefficient</i> )
R <sup>2</sup> <sub>cv</sub>	– koeficijent determinacije unakrsne validacije (eng. <i>cross-validation</i> ),
R <sup>2</sup> <sub>adj</sub>	– podešeni koeficijent determinacije (eng. <i>Adjusted R<sup>2</sup></i> )
RMS	– koren srednjeg kvadrata (eng. <i>Root Mean Square</i> )
RMSD	– koren srednjeg kvadratnog odstupanja (eng. <i>Root Mean Square Deviation</i> )
RMSE	– koren srednje kvadratne greške (eng. <i>Root Mean Square Error</i> )
RP	– reverzna faza (eng. <i>Reversed Phase</i> )
RP-HPLC	– tečna hromatografija visokih performansi na obrnutim fazama (eng. <i>Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatograph</i> )
RP-LC	– tečna hromatografija na obrnutim fazama, (eng. <i>Reversed Phase Liquid Chromatography</i> )
RP-TLC	– reverzno-fazna hromatografija na tankom sloju (eng. <i>Reversed Phase Thin-Layer Chromatography</i> )

S	– retenciona konstanta (nagib u jednačini 2.5)
SAR	– relacija između strukture i aktivnosti (eng. <i>Structure-Activity Relationship</i> )
SD	– standardna devijacija
test	– test set jedinjenja
TLC	– hromatografija na tankom sloju (eng. <i>Thin-Layer Chromatography</i> )
TPSA	– ukupna polarna površina (eng. <i>Total Polar Surface Area</i> )
TSS	– ukupna suma kvadrata (eng. <i>Total Sum of Squares</i> )
VIF	– faktor inflacije varijanse (eng. <i>Variance Inflation Factor</i> )
VS	– virtuelni skrining

## MOLEKULSKI DESKRIPTORI KORIŠĆENI U KLASIFIKACIJ, QSRR MODELOVANJU I FARMAKOKINETICI

ALOGP	– deskriptor lipofilnosti <sup>1</sup>
ALOGPs	– deskriptor lipofilnosti <sup>1</sup>
ALOGpS	– deskriptor lipofilnosti <sup>1</sup>
AClogP	– deskriptor lipofilnosti <sup>1</sup>
AClogS	– deskriptor lipofilnosti <sup>1</sup>
ACDlogP	– deskriptor lipofilnosti <sup>2</sup>
Average logP	– deskriptor lipofilnosti <sup>1</sup>
Average logS	– deskriptor lipofilnosti <sup>1</sup>
BBB	– krvno-moždana barijera (eng. <i>Blood Brain Barrier</i> ) <sup>2,3</sup>
CLogP	– deskriptor lipofilnosti <sup>4</sup>
Caco-2	– propustljivost ćelija adenokarcinoma kolona prema ispitivanim jedinjenjima <sup>3</sup>
DE	– Dreiding-ova energija <sup>6</sup>
EI	– inhibicija enzima <sup>5</sup>
FUP	– frakcija jedinjenja nevezana za proteine u plazmi (eng. <i>Fraction Unbound in Plasma</i> ) <sup>2</sup>
GPCR	– G protein-spregnuti receptor (eng. <i>G Protein-Coupled Receptor</i> ) <sup>5</sup>
HBA	– akceptori vodonične veze (eng. <i>Hydrogen Bonding Acceptors</i> ) <sup>2,6</sup>
HBD	– donori vodonične veze (eng. <i>Hydrogen Bonding Donors</i> ) <sup>2,6</sup>
HIA	– apsorpcija u gastrointestinalnom traktu (eng. <i>Human Intestinal Absorption</i> ) <sup>3</sup>
ICM	– modulatori jonskog kanala (eng. <i>Ion Channel Modulators</i> ) <sup>5</sup>
k <sub>a</sub>	– konstanta apsorpcije jedinjenja (eng. <i>Absorption rate</i> ) <sup>2</sup>

KI	– inhibicija kinaze <sup>5</sup>
log <i>D</i>	– deskriptor lipofilnosti <sup>2</sup>
log <i>S</i>	– deskriptor lipofilnosti <sup>2</sup>
MLOG <i>P</i>	– deskriptor lipofilnosti <sup>1</sup>
miLog <i>P</i>	– deskriptor lipofilnosti <sup>5</sup>
MMFF94	– eng. <i>Merck Molecular Force Field</i> energija <sup>6</sup>
natoms <sub>ali</sub>	– broj alifatičnih C atoma <sup>5,6</sup>
nrotb	– broj rotabilnih veza (eng. <i>Number of rotatable bonds</i> ) <sup>5,6</sup>
NRL	– sposobnost građenja liganada sa nuklearnim receptorom (eng. <i>Nuclear Receptor Ligand</i> ) <sup>5</sup>
PC	– deskriptor lipofilnosti <sup>7</sup>
<i>Pe<sub>eff</sub></i>	– efektivna permeabilnost u jejunumu (eng. <i>Effective Jejunal Permeability</i> ) <sup>2</sup>
PI	– inhibicija proteaze <sup>5</sup>
PN	– površinski napon <sup>2</sup>
PPB	– vezivanje jedinjenja za proteine plazme-vezivanje plazma-protein (eng. <i>Plasma Protein Binding</i> ) <sup>2,3</sup>
V <sub>d</sub>	– zapremina distribucije (eng. <i>Volume of Distribution</i> ) <sup>2</sup>
XLOG <i>P</i> 2	– deskriptor lipofilnosti <sup>1</sup>
XLOG <i>P</i> 3	– deskriptor lipofilnosti <sup>1</sup>

(<sup>1</sup>ALOGPS 2.1; <sup>2</sup>ACD/Labs I-Lab 2.0; <sup>3</sup>PreADMET online program; <sup>4</sup>ChemBioDraw Ultra 12.0; <sup>5</sup>Molinspiration online program; <sup>6</sup>MarvinSketch 15.3.23; <sup>7</sup>ChemBio3D Ultra 12.0)

## ĆELIJSKE LINIJE

A549	– adenokarcinom pluća
Hs294T	– melanom
HT-29	– kancer debelog creva (kolona)
MRC-5	– normalne ćelije fetalnih fibroplasta pluća
PC3	– kancer prostate

# SADRŽAJ

## IZVOD

## ABSTRACT

## SPISAK SKRAĆENICA

<b>UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OPŠTI DEO.....</b>	<b>4</b>
2.1. STIRIL LAKTONI.....	4
2.1.1. Prirodni stiril laktoni.....	4
2.1.2. Mehanizam delovanja stiril laktone .....	7
2.1.3. Sintetisani stiril laktoni.....	8
2.1.3.1. Derivati i analozi goniofufurona.....	8
2.2. OSOBINE JEDINJENJA POTENCIJALNIH FARMACEUTSKIH AGENASA .....	13
2.2.1. Pravila za brzo profilisanje jedinjenja na osnovu strukture.....	14
2.2.2. Lipofilnost .....	15
2.2.2.1. Hromatografska lipofilnost.....	19
2.3. VEZE IZMEĐU STRUKTURE I OSOBINA JEDINJENJA – HEMOMETRIJSKA ANALIZA .....	21
2.3.1. QSAR analiza .....	22
2.3.1.1. 3D-QSAR analiza .....	23
2.3.2. QSRR analiza .....	24
2.3.3. Statistički pristupi u QSAR i QSRR analizama .....	24
2.3.4. Molekulski deskriptori .....	25
2.4. DIZAJN LEKOVA .....	27
2.4.1. Molekulski doking.....	28

2.5. FARMAKOKINETIKA.....	31
2.5.1. Apsorpcija.....	33
2.5.2. Distribucija .....	34
2.5.3. Veživanje molekula za proteine plazme .....	35
2.5.4. Krvno-moždana barijera.....	36
2.5.5. Permeabilnost.....	37
<b>3. EKSPERIMENTALNI DEO.....</b>	<b>39</b>
3.1. STRUKTURA ISPITIVANIH STIRIL LAKTONA .....	39
3.2. HROMATOGRAFSKA ANALIZA ISPITIVANIH STIRIL LAKTONA.....	39
3.3. IZRAČUNAVANJE MOLEKULSKIH DESKRIPTORA.....	40
3.4. HEMOMETRIJSKA REGRESIJA I KLASIFIKACIJA.....	46
3.4.1. Hijerarhijska klaster analiza.....	46
3.4.2. Linearna regresija .....	47
3.4.3. Multipla linearna regresija.....	47
3.4.4. Regresija parcijalnih najmanjih kvadrata .....	47
3.4.5. Validacija QSAR/QSRR modela.....	48
3.5. ISPITIVANJE KORELACIJE <i>IN SILICO</i> FARMAKOKINETIČKIH OSOBINA I MOLEKULSKIH DESKRIPTORA .....	50
3.6. ISPITIVANJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI STIRIL LAKTONA.....	50
3.7. MOLEKULSKI DOKING STIRIL LAKTONA.....	51
3.8. 3D-QSAR ANALZA STIRIL LAKTONA .....	51
<b>4. REZULTATI I DISKUSIJA .....</b>	<b>53</b>
4.1. ANALIZA STRUKTURE ISPITIVANIH STIRIL LAKTONA .....	53
4.2. HROMATOGRAFSKA ANALIZA ISPITIVANIH STIRIL LAKTONA.....	54
4.2.1. Hromatografska retencija.....	54
4.2.2. Korelacija retencionih parametara $\log k_o$ i $S$ sa <i>in silico</i> lipofilnim parametrima molekula .....	59
4.2.3. Hijerarhijska klaster analiza.....	64
4.2.4. QSRR modelovanje za predviđanje hromatografske lipofilnosti .....	66
4.3. QSPKR ANALIZA FARMAKOKINETIČKIH OSOBINA STIRIL LAKTONA .....	78

4.3.1. Korelacija in silico farmakokinetičkih parametara i retencionih konstanti lipofilnosti .....	78
4.3.2. Korelacije in silico farmakokinetičkih parametara sa drugim molekulskim deskriptorima.....	92
4.3.3. Korelacija in silico farmakoloških receptora i retencionih konstanti lipofilnosti .	98
4.4. BIOLOŠKA EVALUACIJA I SAR ANALIZA ISPITIVANIH STIRIL LAKTONA ....	101
4.5. MOLEKULSKI DOKING I 3D-QSAR ANALIZA ISPITIVANIH STIRIL LAKTONA .....	111
4.5.1. Analiza molekulskog dokinga.....	112
4.5.2. 3D-QSAR analiza .....	116
<b>5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>120</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>128</b>
<b>7. PRILOG .....</b>	<b>145</b>
<b>BIOGRAFIJA .....</b>	<b>163</b>

## UVOD

Kancer je po brojnosti uzročnik velike smrtnosti ljudi širom sveta, pa postoji stalna potreba za iznalaženjem novih i efikasnijih citotoksičnih agenasa, kako iz prirodnih izvora tako i onih dobijenih sintezom. Od ključnog značaja za biološku aktivnost većine jedinjenja je njihova mogućnost da prođu kroz biološke membrane pasivnom difuzijom. U ovaj proces uključeno je više koraka raspodele i difuzije odnosno raspodele između intra- i ekstracelularne sredine i fosfolipidnih membrana. Ipak, od brojnih kandidata za lekove utvrđeno je da je njih blizu 50% neuspešno zbog slabe bioraspoloživosti koja je rezultat neefikasne intestinalne apsorpcije i niske metaboličke stabilnosti. Pored toga, visoka toksičnost pojedinih jedinjenja je takođe jedan od limitirajućih faktora za njihovu potencijalnu primenu u terapiji. Zato su ADMET (apsorpcija, distribucija, metabolizam, eliminacija, toksičnost) osobine presudne za eventualnu kliničku primenu potencijalnih lekova.

Dosadašnja ispitivanja prirodnih stiril laktona 7-(+)-goniofufurona, 7-*epi*-(+)-goniofufurona, krasalaktona B i C i njihovih novosintetizovanih derivata i analoga ukazala su da oni imaju veliki potencijal kao antitumorski agensi. Međutim, nije poznato da li oni imaju zadovoljavajuće ADMET (apsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija, toksičnost) osobine koje su neophodne da bi neko jedinjenje postalo aktivna komponenta potencijalnog leka. Najveći uticaj na ove osobine kao i na farmakološku aktivnost jedinjenja ima njegova *lipofilnost*, koja predstavlja afinitet molekula ili vrste prema lipofilnom okruženju.

Jedan od kvantitativnih deskriptora lipofilnosti je podeoni koeficijent ( $P$ ), najčešće izražen kao logaritam 1-oktanol/voda podeonog koeficijenta ( $\log P_{\text{oct}}$ ) za nejonizujuća jedinjenja ili logaritam koeficijenta distribucije ( $\log D$ ) koji opisuje lipofilnost svih oblika molekula pri datim vrednostima pH. Veoma pogodna metoda za određivanje  $\log P$  je tečna hromatografija na obrnutim fazama, RP-LC (eng. *Reversed Phase Liquid Chromatography*). Brojne publikacije potvrđuju značajne korelacije između retencionih podataka jedinjenja, kao alternativnih parametara lipofilnosti dobijenih reverzno-faznom hromatografijom na tankom sloju, RP-TLC (eng. *Reversed Phase Thin Layer Chromatography*) i reverzno-faznom hromatografijom visokih performansi (pod visokim pritiskom), RP-HPLC (eng. *High*



*Performance (Pressure) Liquid Chromatography*) sa vrednostima podeonog koeficijenta  $\log P_{\text{oct}}$ .

Proces definisanja novih biološki aktivnih jedinjenja olakšan je brojnim hemometrijskim pristupima koji definišu kvantitativne zavisnosti između strukture i različitih osobina molekula. QSPR analiza (eng. *Quantitative Structure Property Relationship*) podrazumeva kvantitativnu zavisnost između strukture i fizičko-hemijskih osobina molekula, a QSAR analiza (eng. *Quantitative Structure Activity Relationship*) povezuje strukturu jedinjenja i njegovu biološku aktivnost. Uobičajena tehnika koja pokazuje zavisnost između molekulskih deskriptora koji karakterišu strukturu ispitivanih jedinjenja i retencionog ponašanja molekula u različitim hromatografskim sistemima je kvantitativna zavisnost između strukture i retencije, QSRR (eng. *Quantitative Structure-Retention Relationship*). Korelacije hromatografskih parametara sa *in silico* odabranim farmakokinetičkim i bioaktivnim deskriptorima ukazuju na ADMET osobine jedinjenja i predstavljaju kvantitativnu zavisnost između strukture i farmakokinetičkih osobina, QSPKR (eng. *Quantitative Structure-Pharmacokinetic Relationship*). Navedenim pristupima mogu se konstruisati predikcioni regresioni modeli, koje je moguće dalje koristiti u ispitivanju osobina novih hemijskih jedinjenja koja još nisu sintetizovana ni ispitana bilo u *in vitro* i/ili u *in vivo* eksperimentima.

Za predviđanje i objašnjenje biološke aktivnosti nekog jedinjenja često se koristi i molekulski doking (eng. *Molecular docking*). automatizovani kompjuterski algoritam kojim se ligand pozicionira u aktivno mesto receptora. Na taj način se dobija neposredan uvid u vezivanje aktivnog jedinjenja i odgovarajućeg biološkog receptora (najčešće nekog proteina, odnosno enzima). Međutim, za primenu ove analize neophodno je poznavanje strukture ciljanog proteina. Stabilnost generisanih protein-ligand kompleksa vrednuju se preko specifičnih „skor“ (eng. *Score*) funkcija, koje su zasnovane na različitim principima i imaju različite nivoe tačnosti.

U analizama prirodnih i novosintetizovanih stiril laktona, koji su predmet istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji, do sada nisu rađena ispitivanja njihove lipofilnosti i farmakokinetičkih osobina niti je primenjena neka od navedenih kvantitativnih metodologija. Takođe, postojala je mogućnost ispitivanja antiproliferativne aktivnosti tih molekula na nove humane maligne ćelije. Zato su ciljevi ove doktorske disertacije bili sledeći:

- (1) Eksperimentalno određivanje hromatografskih retencionih parametara lipofilnosti prirodnih stiril laktona 7-(+)-goniofufurona, 7-*epi*-(+)-goniofufurona, krasalaktona

B i C i njihovih novosintetizovanih derivata i analoga reverzno-faznom tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom (RP-HPLC) sa dvokomponentim pokretnim fazama metanol-voda i acetonitril-voda. Uz to, utvrđivanje najboljih prediktivnih modela kvantitativne zavisnosti između *in silico* molekulskih deskriptora odnosno strukture jedinjenja i eksperimentalno dobijenih retencionih parametara primenom hemometrijske QSRR analize;

- (2) Ispitivanje korelacije između hromatografskih retencionih konstanti, alternativnih parametara lipofilnosti, i *in silico* farmakokinetičkih osobina stiril laktone. Pored toga, definisanje i statistička potvrda, najboljih višestrukih linearnih regresionih modela zavisnosti farmakokinetičkih parametara i od drugih molekulskih deskriptora;
- (3) Biološka evaluacija uticaja ispitivanih jedinjenja na ćelije nekoliko humanih tumora: kancer prostate, kancer debelog creva, melanom i adenokarcinom pluća. Takođe, utvrđivanje zavisnosti između strukture jedinjenja i biološke aktivnosti, SAR analiza (eng. *Structure Activity Relationship*), potom ispitivanje veze stiril laktone i ciljanog proteina za kancer prostate (molekulski doking) kao i 3D-QSAR CoMFA (eng. *Comparative Molecular Field Analysis*) i CoMSIA (eng. *Comparative Molecular Similarity Index Analysis*) analiza njihove biološke aktivnosti na istu ćelijsku liniju.

## 2. OPŠTI DEO

### 2.1. Stiril laktoni

U primarnoj zaštiti zdravlja široku primenu nalaze medicinske biljke koje imaju dugu istoriju i u tretmanu kancera. Pokazalo se da mnoge tropske biljke poseduju interesantne biološke aktivnosti sa potencijalnim terapijskim primenama. *Goniothalamus* je jedan od najrasprostranjenijih rodova iz porodice Annonaceae sa preko 160 vrsta poreklom iz tropskih regiona jugoistočne Azije. Hemijska jedinjenja iz roda *Goniothalamus* (Aslam i sar., 2016) pokazuju različite biološke aktivnosti: citotoksičnost (revijalni prikazi u Blázquez i sar., 1999; de Fatima i sar., 2006; Seyed i sar., 2014; Choo i sar., 2014; Abdullah i sar., 2013; Duc i sar., 2016; Erum i sar., 2016; Boonmuen i sar., 2016), antilarvicidalna, antimalarijska i antibakterijska aktivnost (Lekphrom i sar., 2009; Al Momani i sar., 2011; Konsam i sar., 2015), antituberkulozna aktivnost (Macabeo i sar., 2013; Robine, 2015), antiviralna aktivnost (Ahmad i sar., 2010), antiinflamatorna aktivnost (Orlikova i sar., 2013), antioksidativna aktivnost (Iqbal i sar., 2015). Glavna jedinjenja iz roda *Goniothalamus* su *stiril laktoni*, *acetogenini* i *alkaloidi*.

#### 2.1.1. Prirodni stiril laktoni

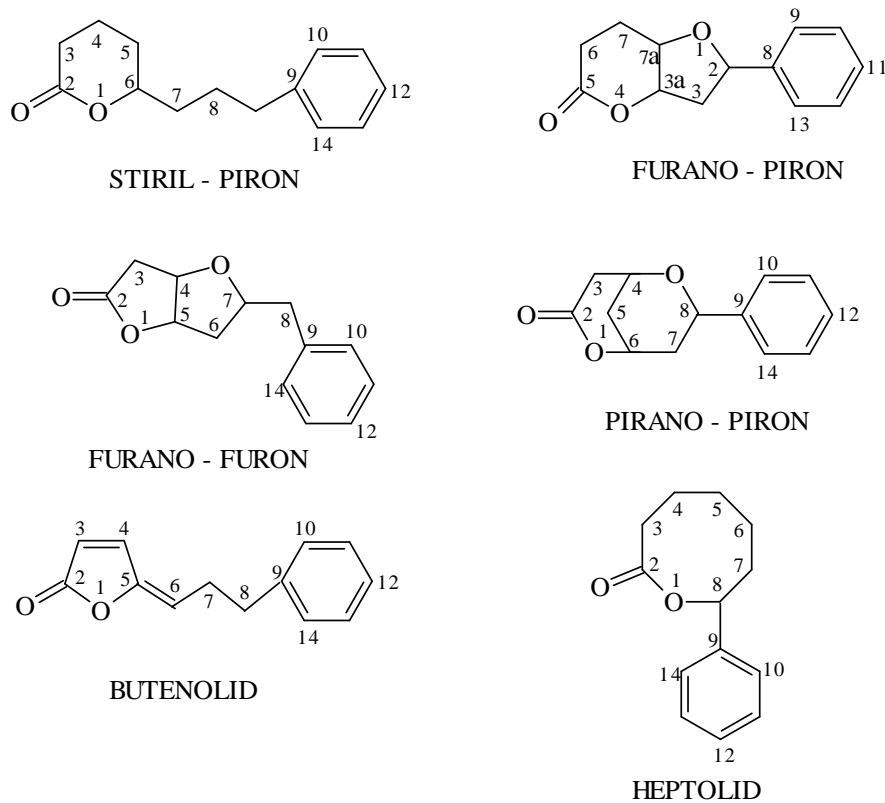
Prirodni stiril laktoni su grupa sekundarnih metabolita roda *Goniothalamus* koja imaju značajne biološke aktivnosti, posebno antiproliferativnu aktivnost prema više linija ćelija kancera (Blázquez i sar., 1999; Tian i sar., 2006; de Fatima i sar., 2006; Wiart, 2007; Tran i sar., 2013; Choo i sar., 2014; Seyed i sar., 2014; Duc i sar., 2016; Thienthiti i sar., 2017). Primeri citotoksične aktivnosti odabranih prirodnih stiril laktone navedeni su u *Tabeli 2.1*.

Na osnovu strukturnih karakteristika skeletona stiril laktoni dele se u šest grupa: stiril-pironi, furano-pironi, furano-furoni, pirano-pironi, butenolidi i heptolidi (Blázquez i sar., 1999), *Slika 2.1*.

Tabela 2.1. Citotoksične aktivnosti nekih prirodnih stiril laktona (de Fatima i sar., 2006; Choo i sar., 2014)

Jedinjenje	Inhibiciona koncentracija, IC <sub>50</sub> (μM)							MDA-MB-231
	HL-60	A-549	MCF-7	KB	HT-29	HCT-8	A2780	
Goniotalamin	2,9	1,7	4,7	6,3				
Goniotalamin oksid				14,8				
Goniofupiron		225	>400		152			
Altolakton				13,1	10,7			
Goniofufuron		19,0	>100	100	>100			
8-Acetilgoniofufuron				4,4		3,2		
Goniopipiron		2,6	2,7	0,1	2,7	25,8	10,0	
5-Acetilgoniopipiron			13,4	2,5		1,1	1,6	
Goniobutenolid A		16,1	33,4		14,7			5,9
Goniobutenolid B		3,8	85,6		11,5			6,0
Gonioheptolid A		15,1	258		48,4			
Gonioheptolid B		82,0	36,9		23,3			

IC<sub>50</sub> – koncentracija jedinjenja koja inhibira rast 50% ćelija u poređenju sa netretiranom kontrolom; HL-60 – promijelocitna leukemija; A-549 – adenokarcinom pluća; MCF-7 – humani kancer dojke (adenokarcinom dojke pozitivan na estrogenske i progesteronske receptore); KB – humani oralni epidermalni kancer; HT-29 – adenokarcinom kolona; HCT-8 – humani kancer kolona; A2780 – humani kancer jajnika; MDA-MB-231 – adenokarcinom dojke negativan na estrogenske i progesteronske receptore.



Slika 2.1. Tipovi skeleta stiril laktona izolavanih iz roda *Goniothalamus*

**Stiril-pironi.** Stiril-pironi predstavljaju najznačajniju grupu stiril laktona zbog bronosti identifikovanih jedinjenja i vrsta koje ih sadrže. Prvi član ove klase, goniotalamin izolovan je 1967. iz kore *Cryptocaria coloneura*, a 1972. dobijen je iz *Goniothalamus* vrsta (Jewers i sar., 1972). Ovo jedinjenje može se posmatrati kao biogenetski prekursor drugih grupa stiril laktona. Ima značajan potencijal u razvoju lekova za kancer a pokazano je da ima široku biološku aktivnost uključujući antineoplastične, antiinflamatorne, imunosupresivne i apoptoične efekte (Seyed i sar., 2014).

**Furano-pironi.** Druga po brojnosti klasa stiril laktona u vrstama *Goniothalamus* je ona sa furano-pironskim skeletom. Prvo takvo jedinjenje iz ove klase, altolakton (trivijalni naziv goniotalenol), izolovan je 1985. iz *Goniothalamus giganteus* (El-Zayat i sar., 1985). Neka od ovih jedinjenja imaju citotoksičnu aktivnost prema više ćelijskih linija kancera (de Fatima i sar., 2006).

**Furano-furoni.** Goniofufuron i 7-*epi*-goniofufuron su najpoznatiji članovi ove grupe stiril laktona. Izolovani su 1991. iz kore stabljike *Goniothalamus giganteus* (Fang i sar., 1990; 1991a) i razlikuju se u stereochemiji na C-7. Potencijalni su antitumorski agensi (de Fatima i sar., 2006; Choo i sar., 2014) i bili su predmet su brojnih totalnih sinteza.

**Pirano-pironi.** Jedinjenja iz ove grupe pokazuju vrlo visoku, neselektivnu aktivnost prema ćelijskim linijama humanih tumora (de Fatima i sar., 2006). Primeri ovih jedinjenja su goniopipiron i 5-acetilgoniopipiron. Izolovani su iz *Goniothalamus giganteus* (Fang i sar., 1990).

**Butenolidi.** Dva dobro poznata butenolida su goniobutenolid-A i goniobutenolid-B. Prvobitno su izolovani iz etanolnog ekstrakta *Goniothalamus giganteus*, a kasnije iz *Goniothalamus borneesis* (Fang i sar., 1991b). Prema nekim tumorskim ćelijama pokazuju značajnu, a prema nekim umerenu antiproliferativnu aktivnost (de Fatima i sar., 2006).

**Heptolidi.** Za jedinjenja ove grupe karakterističan je neuobičajeni, zasićeni osmočlani laktonski skelet ( $\zeta$ -lakton). Gonioheptolidi –A i –B su izolovani iz kore stabljike *Goniothalamus giganteus* (Fang i sar., 1993). Nalaženje heptolida i furano-pirona u istim *Goniothalamus* vrstama ukazuje na biosintetičku povezanost između ova dva tipa laktona posebno kada se uzme u obzir njihova međusobna hemijska interkonverzija (Blásquez i sar., 1999).

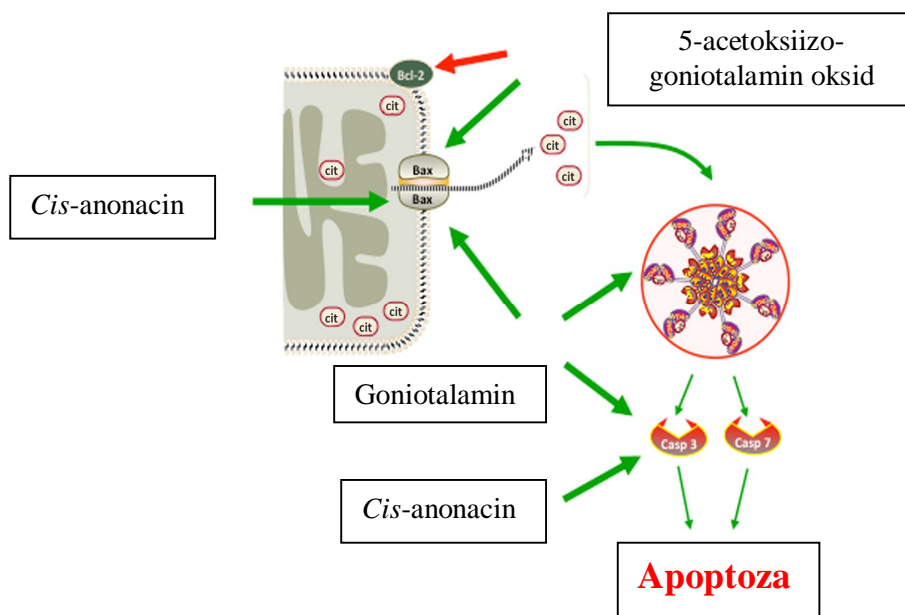
### 2.1.2. Mehanizam delovanja stiril laktona

Kako se iz primera u *Tabeli 2.1* vidi, stiril laktoni imaju značajnu citotoksičnu aktivnost prema određenim ćelijama kancera. Izlaganje ćelija delovanju citotoksičnog jedinjenja može dovesti do:

- nekroze ćelija, pri čemu one gube membranski integritet i brzo umiru usled liziranja;
- prestanka aktivnog rasta i deobe ćelija (antiproliferacija), ili
- aktivacije genetičkog programa kontrolisane ćelijske smrti (apoptoza).

Seyed i sar. (2014) navode više primera mehanizama delovanja goniotalamina, na različite ćelije kancera i njihove molekulske efekte. Na primer, goniotalamin deluje na ćelije kancera dojke (MCF-7) citotoksično izazivanjem nekroze jer dolazi do gubitka membranskog integriteta. Na ćelije kancera prostate (PC-3) deluje antiproliferativno, dok kod ćelija kancera kolona (HT-29) izaziva apoptozu zaustavljanjem ćelijskog ciklusa u S-fazi. Preko goniotalamina odigrava se apoptoza u ćelijama melanoma (Tangchirakhaphan i sar., 2018).

Na slici 2.2 prikazan je primer apoptoze izazvan odabranim jedinjenjima iz *Goniotalamus* vrsta (Choo i sar., 2014). Kada se ćelije promijelocitne leukemije (HL-60) izlože delovanju 5-acetoksiizo-goniotalamin oksida u količini od 10  $\mu$ M i vremenu od 8 sati, dolazi do značajnog smanjenja ekspresije *Bcl-2* gena i do izrazite povećanja ekspresije *Bax* proteina što snažno indukuje ćelijsku smrt apoptozom.



Slika 2.2. Indukcija smrti ćelije odabranim jedinjenjima iz *Goniotalamus* vrsta (Choo i sar., 2014)

Zelene strelice pokazuju aktivaciju/indukciju; Crvena strelica predstavlja represiju

### 2.1.3. Sintetički stiril laktoni

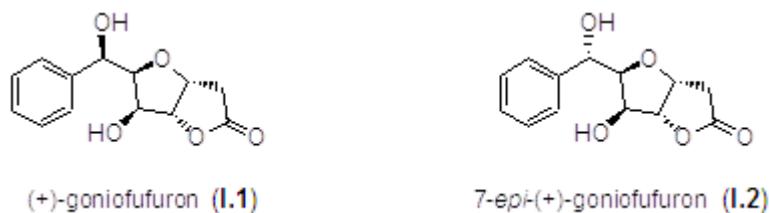
Kako većina bioaktivnih stiril laktona izolovanih iz *Goniothalamus* pokazuje obećavajuće antiproliferativne efekte prema različitim humanim tumorskim ćelijskim linijama (Tabela 2.1), danas se mnogo pažnje posvećuje sintezi prirodnih stiril laktona, njihovih novih derivata i analoga u cilju dobijanja jedinjenja visoke citotoksičnosti, odnosno selektivnosti. Da bi se detaljnije ispitala citotoksična aktivnost i bolje razumeo način delovanja, urađene su sinteze brojnih novih derivata goniotalamina (Zhou i sar., 2005; Barcelos i sar., 2012, 2014; Mohideen i sar., 2013), derivata u seriji altolaktona (Bermejo i sar., 1999), goniofufurona (Mereyala i sar., 1999; Popsavin i sar., 2006; 2007; 2008; 2009; 2010a; 2010b; 2012; Francuz i sar., 2012; 2017; Benedeković i sar., 2014a; 2014b; 2015; Kovačević i sar., 2016; 2017; Ralph i sar., 2016) i jedinjenja sličnih goniotalaminu (Barros i sar., 2014). Ispitivanja zavisnosti struktura-aktivnost, SAR ukazala su da uklanjanje funkcionalnih grupa iz molekula, uvođenje različitih supstituenata u aromatični prsten, položaj supstituenata, uklanjanje aromatičnog prstena, smanjenje veličine zasićenog prstena (sa šest na pet), dodavanje novog prstena i stereohemija jedinjenja različito utiču na citotoksičnu aktivnost sintetizovanih stiril laktona.

Mnogi novosintetizovani stiril laktoni pokazuju jaku citotoksičnost prema brojnim ćelijama humanih kancera, kao što su npr. kancer želuca, SGC-7901 (Zhou i sar., 2005), adenokarcinom dojke pozitivan na estrogenske receptore, MCF-7 (Kovačević i sar., 2016), Burkittov limfom (Raji) (Popsavin i sar., 2008; 2010; Francuz i sar., 2012; Benedeković i sar., 2014a; 2014b), alveolarni bazalni adenokarcinom pluća, A549 (Zhou i sar., 2005; Benedeković i sar., 2015), ćelije leukemije, L-1210 (Bermejo i sar., 1999), promijelocitna leukemija, HL-60 (Zhou i sar., 2005; Popsavin i sar., 2008; 2009; 2010a; Francuz i sar., 2012; Benedeković i sar., 2014b), leukemija T-limfocita, Jurkat (Popsavin i sar., 2009; Francuz i sar., 2012; Mohideen i sar., 2013), hronična mijeloidna leukemija, K-562 (Popsavin i sar., 2010a; Benedeković i sar., 2014a; Francuz i sar., 2017), kancer grlića materice, HeLa (Popsavin i sar., 2012; Benedeković i sar., 2014a), melanom, LOX (Mereyala i sar., 1999), melanom, Hs294T (Benedeković i sar., 2014a), adenokarcinom kolona, HT-29 i kancer prostate, PC3 (Benedeković i sar., 2015).

#### 2.1.3.1. Derivati i analozi goniofufurona

Kako je već rečeno, 7-(+)-goniofufuron i 7-*epi*-goniofufuron, odnosno (+)-goniofufuron (**I.1**) i 7-*epi*-(+)-goniofufuron (**I.2**) (Slika 2.3) su prirodni stiril laktoni iz *Goniothalamus*

*giganteus* sa značajnom citotoksičnom aktivnošću prema nekoliko humanih tumorskih ćelijskih linija (de Fatima i sar., 2006; Choo i sar., 2014).

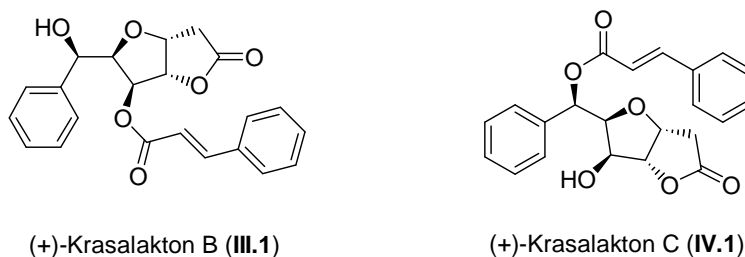


Slika 2.3. Strukture (+)-goniofufurona i 7-epi-(+)-goniofufurona

Struktura ovih jedinjenja razjašnjena je spektroskopskim metodama, a relativna konfiguracija određena je difrakcijom X-zraka. Apsolutnu konfiguraciju utvrdili su 1992. godine nezavisno Shing i saradnici i Gracza i Jager. Zbog svoje jedinstvene strukture i snažne citotoksične aktivnosti, oba prirodna proizvoda, kao i njihovi brojni analozi bili su cilj velikog broja sinteza (Popsavin i sar., 2006; 2007; 2008; 2009; 2010a; 2010b; 2012; Francuz i sar., 2012; 2017; Benedeković i sar., 2014a; 2014b; 2015). Neki autori iz navedenih grupa učestvovali su u sintezi, karakterizaciji i prethodnom ispitivanju antiproliferativne aktivnosti jedinjenja, koja su predmet istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji (Benedeković i sar., 2014a; 2014b).

Totalnu sintezu prirodnih stiril laktona (+)-goniofufurona i 7-epi-(+)-goniofufurona (Slika 2.3) ostvarili su Popsavin i sar. (2007). Tada je utvrđeno da ova jedinjenja pokazuju snažnu citotoksičnu aktivnost prema K-562, Raji i HeLa ćelijama.

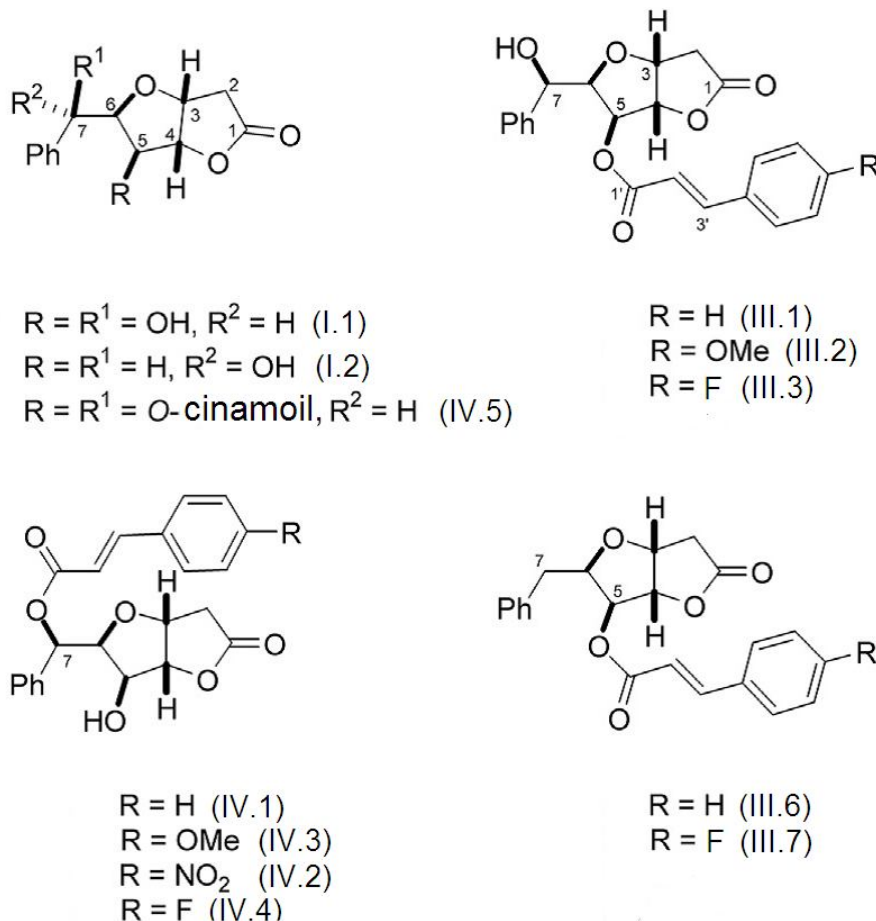
Krasalakton C (Slika 2.4) je prirodni 7-*O*-cinamoil derivat (+)-goniofufurona koji je prvo izolovan iz citotoksičnog etilacetatnog ekstrakta lišća i grančica *Polyalthia crassa* (Tuchinda i sar., 2006). Pored krasalaktona C izolovano je još nekoliko novih citotoksičnih jedinjenja kao što je krasalakton B, koji je 5-*O*-cinamoil ester (+)-goniofufurona (Slika 2.4). Prvu totalnu sintezu (+)-krasalaktona C uradili su Popsavin i saradnici (2007; 2009) polazeći od D-ksiloze. Isti autori su ostvarili i prvu totalnu sintezu krasalaktona B pri čemu je polazno jedinjenje bila D-glukoza (Popsavin i sar., 2010b).



Slika 2.4. Strukture (+)-krasalaktona B i (+)-krasalaktona C

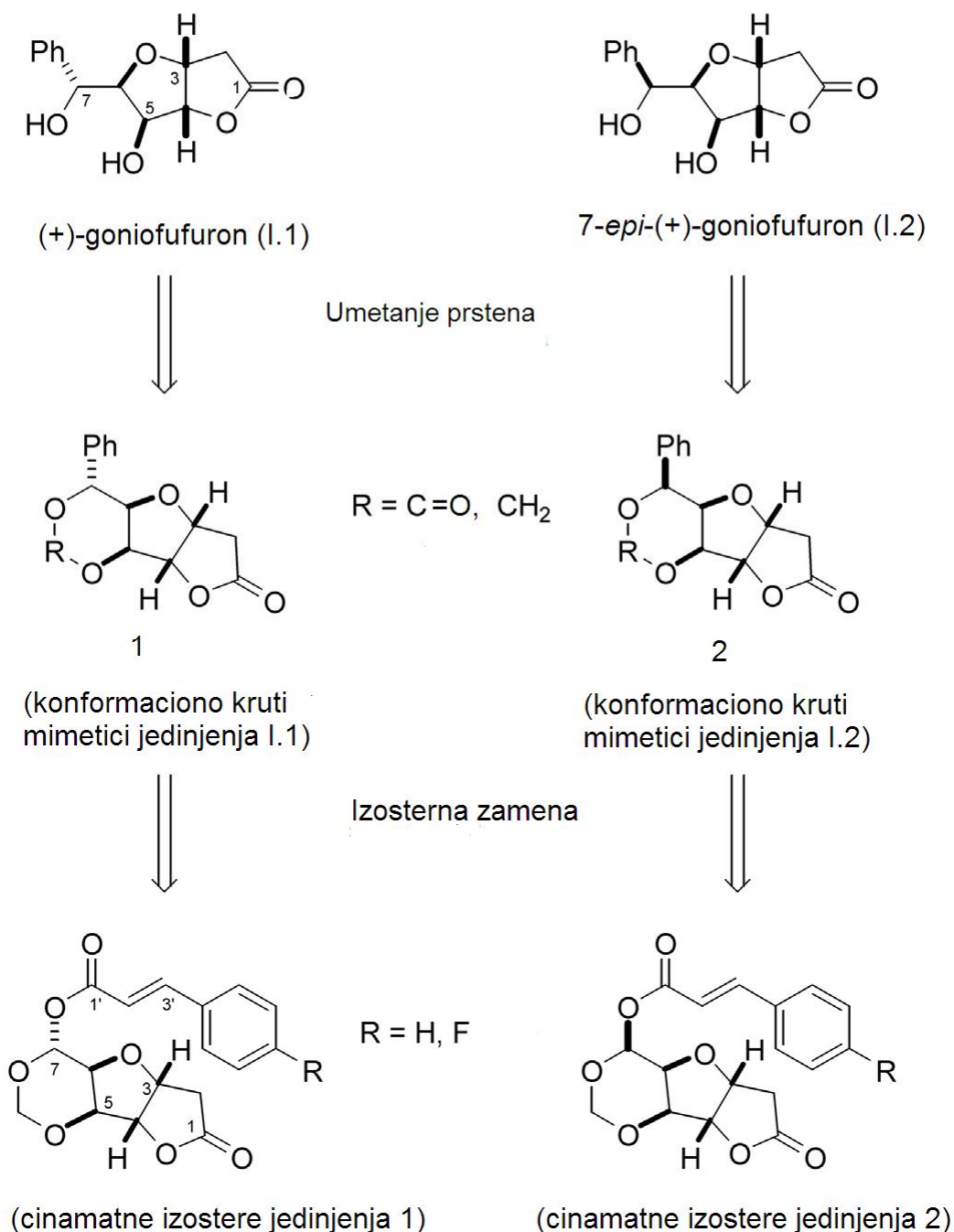


Benedeković i sar. (2014b) opisali su efikasnu semi-sintezu prirodnih stiril laktona (+)-krsalaktona B i C, više njihovih analoga, epimera i derivata polazeći od (+)-goniofufurona, **I.1**, ili od 7-*epi*-(+)-goniofufurona, **I.2** (Slika 2.5).



Slika 2.5. Strukture (+)-goniofufurona (I.1), 7-*epi*-(+)-goniofufurona (I.2), (+)-krsalaktona B (III.1), (+)-krsalaktona C (IV.1) i analoga (Benedeković i sar., 2014b)

Benedeković i sar. (2014a) su sintetizovali i triciklične laktone, koji predstavljaju konformaciono krute analoge (+)-goniofufurona i 7-*epi*-(+)-goniofufurona, a takođe i seriju odgovarajućih novih cinamatnih bioizostera (Shema 2.1). Poseban interes za estarsku grupu cimetne kiseline u vezi je sa njenim prisustvom u nekoliko prirodnih stiril laktona izolovanih iz tropske biljke *Polyalthia crassa*, koji su pokazali snažnu i selektivnu citotoksičnost prema ćelijama nekih humanih tumora (Tuchinda i sar., 2006; Popsavin i sar., 2010a; 2010b).



Shema 2.1. Dizajn konformaciono krutih mimetika prirodnih proizvoda **I.1** i **I.2**, kao i odgovarajućih cinamatnih izostera (Benedeković i sar., 2014a)

Do sada ispitana *in vitro* citotoksična aktivnost sintetizovanih prirodnih stilir laktona (+)-goniofufurona i 7-*epi*-(+)-goniofufurona, (+)-krasalaktone B, (+)-krasalaktone C i njihovih novosintetizovanih derivata i analoga, koji su predmet daljih istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji, data je u Tabeli 2.2 (Benedeković i sar., 2014a; 2014b). Strukture i nazivi jedinjenja dati su u Tabeli 3.1 (Poglavlje 3).

**Tabela 2.2.** *In vitro* citotoksičnost (+)-goniofufurona (**I.1**) i 7-*epi*-(+)-goniofufurona (**I.2**), odgovarajućih konformaciono krutih analoga (**II.1-II.7**), krasalaktona **B** (**III.1**) i **C** (**IV.1**), odgovarajućih derivata (**III.2-III.7**, **IV.2-IV.7**) i **DOX** (Benedeković i sar., 2014a; 2014b)

Jed.	IC <sub>50</sub> (μM)							
	Ćelijske linije							
	K-562	HL-60	Jurkat	Raji	MCF-7	MDA-MB-231	HeLa	MRC-5
<b>I.1</b>	0,041	>100	32,45	18,45	16,59	73,34	8,32	>100
<b>I.2</b>	0,028	22,02	18,64	1,25	9,24	58,70	0,89	>100
<b>II.1</b>	4,46	12,85	7,89	15,78	32,45	>100	5,67	>100
<b>II.2</b>	>100	14,34	13,64	12,45	27,79	>100	12,36	>100
<b>II.3</b>	>100	10,08	18,21	17,89	23,45	>100	18,87	>100
<b>II.4</b>	0,023	0,24	3,33	1,01	8,08	>100	3,02	>100
<b>II.5</b>	3,016	8,08	5,06	1,01	27,32	4,08	0,001	>100
<b>II.6</b>	>100	8,45	>100	7,56	>100	2,36	0,23	>100
<b>II.7</b>	>100	2,36	>100	5,78	>100	>100	0,02	>100
<b>III.1</b>	0,78	2,54	0,12	14,61	0,85	5,32	0,98	>100
<b>III.2</b>	4,21	50,21	13,37	5,69	11,08	>100	18,63	>100
<b>III.3</b>	10,24	11,52	17,56	11,08	14,87	25,66	29,88	>100
<b>III.4</b>	2,63	0,11	1,12	2,54	20,21	7,32	3,21	>100
<b>III.5</b>	1,12	1,12	3,52	1,02	56,21	2,64	1,66	>100
<b>III.6</b>	4,67	2,21	0,29	0,88	58,64	4,32	1,25	>100
<b>III.7</b>	0,25	1,02	2,63	1,52	28,99	8,22	1,02	>100
<b>IV.1</b>	3,36	>100	25,45	15,46	7,34	87,98	11,25	>100
<b>IV.2</b>	2,25	14,32	10,54	16,38	5,23	33,41	35,69	>100
<b>IV.3</b>	3,25	41,39	42,31	4,37	12,32	>100	24,88	>100
<b>IV.4</b>	4,58	9,45	18,09	15,45	18,66	29,64	24,11	>100
<b>IV.5</b>	21,36	3,33	2,65	11,01	>100	>100	12,24	48,64
<b>IV.6</b>	14,23	10,47	24,58	4,36	4,15	64,25	4,01	>100
<b>IV.7</b>	11,54	8,79	18,64	8,45	9,64	28,64	11,02	>100
<b>DOX</b>	0,25	0,92	0,03	2,98	0,20	0,09	0,065	0,10

IC<sub>50</sub> – koncentracija jedinjenja koja inhibira rast 50% ćelija u poređenju sa netretiranom kontrolom; K-562 – hronična mijeloidna leukemija; HL-60 – promijelocitna leukemija; Jurkat – leukemija T-limfocita; Raji – Burkittov limfom; MCF-7 – adenokarcinom dojke pozitivan na estrogenske i progesteronske receptore (ER<sup>+</sup>); MDA-MB-231 – adenokarcinom dojke negativan na estrogenske i progesteronske receptore (ER<sup>-</sup>); HeLa – kancer grlića materice; MRC-5 – normalne ćelije fetalnih fibroplasta pluća; DOX (doksorubicin) – standardni antitumorski agens;

Iz rezultata prikazanih u *Tabeli 2.2* može se zaključiti da su sintetisani prirodni stiril laktoni (+)-goniofufuron, **I.1** i 7-*epi*-(+)-goniofufuron, **I.2**, (+)-krasalaktoni **B** i **C**, **III.1** i **IV.1** kao i njihovi novosintetizovani derivati i analozi, izuzev dicinamoil estra (**IV.5**), u potpunosti neaktivni prema normalnim MRC-5 ćelijama, tj. IC<sub>50</sub> vrednost je iznad 100 μM. Prema ovim

ćelijama standardni antitumorski agens doksorubicin (DOX) ima submikromolarnu aktivnost (0,10  $\mu\text{M}$ ). Ovo ukazuje na povećanu selektivnost ispitivanih jedinjenja prema tumorskim u odnosu na normalne ćelije, pa je realno očekivati da ova jedinjenja pokažu umanjene neželjene sporedne efekte pri hemoterapiji. Novosintetizovani derivati krasalaktone B (III.4 – III.7) i analozi (+)-goniofufurona i 7-*epi*-(+)-goniofufurona II.4 i II.5 su potentniji inhibitori proliferacije određenih tumorskih ćelija od DOX. Najmanju submikromolarnu aktivnost od 0,001  $\mu\text{M}$ , koja je 65 puta veća od DOX, pokazuje triciklični analog, odnosno konformaciono kruta cinamatna izostera (+)-goniofufurona jedinjenje II.5 i to prema ćelijama grlića materice (HeLa). Takođe, iz iste grupe analoga veoma jaki inhibitori antiproliferativne aktivnosti K-562 i HeLa tumorskih ćelija su jedinjenja II.4 i II.7.

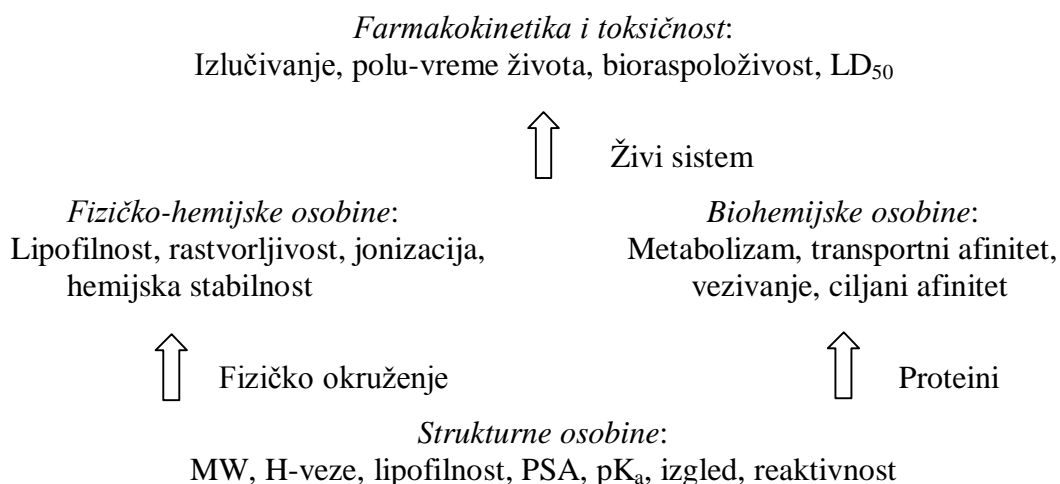
Generalno, novosintetizovani stiril laktoni u značajnom broju imaju zadovoljavajuću citotoksičnost ( $\text{IC}_{50} < 20 \mu\text{M}$ ). Najmanje je izražena inhibicija antiproliferativne aktivnosti MCF-7 i MDA-MB-231 tumorskih ćelija (Tabela 2.2).

## 2.2. Osobine jedinjenja potencijalnih farmaceutskih agenasa

U razvoju aktivnih lekovitih supstanci naučnici uključuju sledeće osobine jedinjenja:

- *Strukturne*: vodonične veze, lipofilnost, molekulska masa, MW (eng. *Molecular Weight*), polarna površina, PSA (eng. *Polar Surface Area*), izgled, reaktivnost, kiselost ( $\text{pK}_a$ );
- *Fizičko-hemijske*: lipofilnost, rastvorljivost, permeabilnost, hemijska stabilnost;
- *Biohemijske*: metabolizam, (faze I i II), vezivanje za protein i ćeliju; transport;
- *Farmakokinetičke i toksičnost*: klirens (izlučivanje), poluvreme života, bioraspoloživost, interakcija lek-lek,  $\text{LD}_{50}$  (eng. *Letal Dose*).

Na Slici 2.6 prikazano je kako struktura određuje osobine jedinjenja.



Slika 2.6. Osobine jedinjenja određene strukturom (Kerns i Di, 2008)

*LD-letalna doza; MW-molekulska masa; PSA-polarna površina*

Međusobne interakcije strukturnih osobina jedinjenja sa fizičkom sredinom uzrokuje njegove fizičko-hemijske osobine. U interakciji strukturnih osobina sa proteinima dolaze do izražaja biohemijske osobine. Kada fizičko-hemijske i biohemijske osobine inter-reaguju sa živim sistemima, one uzrokuju farmakokinetičke osobine i toksičnost.

### 2.2.1. Pravila za brzo profilisanje jedinjenja na osnovu strukture

Najbrža metoda za evaluaciju osobina jedinjenja kao mogućeg farmaceutskog agensa jeste primena “pravila”. Pravila su smernice za strukturne osobine jedinjenja koja imaju najveću mogućnost da budu dobro apsorbovana nakon oralne administracije. Ova pravila su dobijena analizom određenih velikih baza podataka koje su korišćene za razlikovanje molekula koji se dobro apsorbuju od molekula koji se slabo apsorbuju.

Lipinski i sar. (2001), na osnovu analize 2245 lekova iz World Drug Index (WDI), definisali su “*pravilo od 5*” (eng. „*the rule of 5*“) poznato i kao “*pravila Lipinskog*”, prema kojem je loša apsorpcija ili permeacija verovatnija kada jedinjenje ima:

- Više od 5 H-donorskih veza (izraženo kao zbir svih OH i NH);
- Molekulsku masu preko 500;
- Log*P* (Clog*P*) iznad 5 (ili Mlog*P* iznad 4,015);
- Više od 10 H-akceptorskih veza (izraženo kao zbir N i O).

Fizičko-hemijske osobine značajno utiču na pasivnu transcelularnu permeaciju jedinjenja kroz krvno-moždanu barijeru, BBB (eng. *Blood-Brain Barrier*). Istraživanja su pokazala da su za iznalaženje lekova za centralni nervni sistem glavne strukturne osobine jedinjenja sledeće (Pardridge, 1995; 1998; Doan i sar., 2002; Clark, 2003):

- H-veze (akceptorske i donorske);
- Lipofilnost;
- Polarna površina (PSA);
- Molekulska masa (MW);
- Kiselost.

Pardridge (1995) je prvi predložio set fizičko-hemijskih BBB pravila. Samo mali molekuli, koji su rastvorni u lipidima i imaju molekulsku masu manju od 400-600 Da, transportuju se kroz BBB preko lipidne medijacije u farmakološki značajnim količinama:

- Ukupan broj H-veza manji od 8 – 10;

- Molekulska masa manja od 400 – 600 Da;
- Nisu kiseline.

Clark (2003) je predložio „pravila palca“ (eng. „rules of thumb“) kao jednostavnu smernicu u pogledu molekulskih osobina koje su pogodne za moždanu propustljivost:

- *Pravilo 1*: ako je zbir atoma azota i kiseonika (N+O) u molekulu 5 ili manji, tada je molekulu olakšana moždana propustljivost;
- *Pravilo 2*: ako je  $\text{Clog}P - (\text{N}+\text{O}) > 0$ ;
- *Pravilo 3*: polarna površina (PSA) jedinjenja treba da je ispod  $90 \text{ \AA}^2$  ( $60 - 70 \text{ \AA}^2$ );
- *Pravilo 4*: molekulska masa ispod 450 Da;
- *Pravilo 5*:  $\log D = 1 - 3$ .

Ova pravila su korisna za procenjivanje BBB propustljivosti pre sinteze jedinjenja.

Treba istaći da su „pravilo od 5“, „pravila palca“ i druga pravila samo minimalni kriterijumi za odabir molekula za dalja ispitivanja kao potencijalnih terapeutika.

### 2.2.2. Lipofilnost

Lipofilnost molekula je glavna fizičko-hemijska osobina od velikog značaja za razvoj lekovitih supstanci, agrohemijskih i uopšte hemikalija (Valko, 2004; Kerns i Di, 2008; Narayan Das i Roy, 2016). Jedan je od parametara koji utiče na biološku aktivnost jedinjenja i važna je za opisivanje i farmakodinamičkih i farmakokinetičkih osobina delovanja lekova. Naime, to je ključni parametar koji kontroliše mnoge fenomene kao što su rastvorljivost, oralna apsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija (eliminacija) i toksičnost (ADMET) ili bioakumulacija (Waring, 2010; Arnott i Planey, 2012; Martel i sar., 2016). Pored toga, ova osobina je bitna i za permeabilnost, vezivanje proteina i penetraciju bioaktivnih supstanci kroz krvno-moždanu barijeru (Dabrowska i sar., 2011). Takođe, lipofilnost jedinjenja jedan je od najznačajnijih parametara i u QSAR analizi (Jevrić i sar., 2017; Karadžić i sar., 2017). Prema „IUPAC Gold Book“ (1997) lipofilnost predstavlja afinitet molekula ili vrste prema lipofilnom okruženju.

Opšte prihvaćen kvantitativni deskriptor lipofilnosti jedinjenja, koji predstavlja logaritam koeficijenta raspodele (podeoni koeficijent) 1-oktanol/voda ( $\log P_{\text{oct}}$ ) za neutralna (nejonizujuća) jedinjenja (Gaudette i Brodie, 1959; Hansch i Fujita, 1964).

$$\log P = \log \frac{c_o}{c_w} \quad (2.1)$$

gde je  $c_o$  koncentracija ispitivanog jedinjenja u *I*-oktanolu, a  $c_w$  koncentracija ispitivanog jedinjenja u vodi. *I*-Oktanol je izabran kao dobra aproksimacija biološke membrane zbog svojih osobina koje ga čine sličnim lipidima – dug ugljovodonični niz i prisustvo OH grupe, koja može biti i donor i akceptor u vodoničnoj vezi (Leahy i sar., 1989).

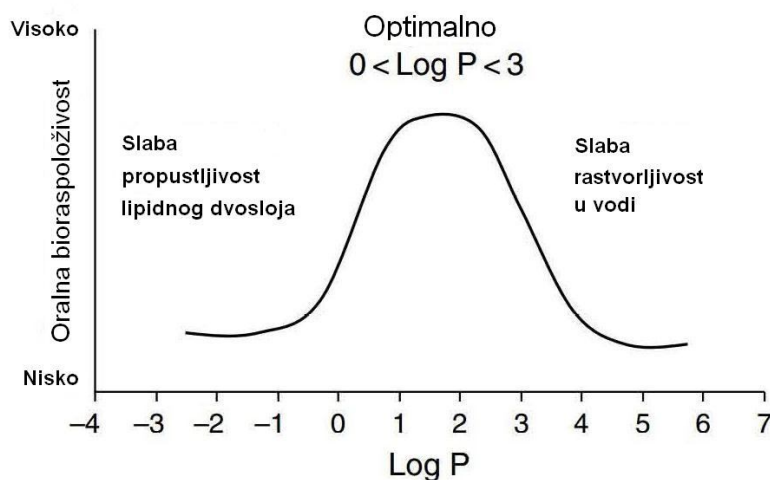
Ako je supstanca jonizujuća, drugi kvantitativni deskriptor lipofolnosti molekula je koeficijent distribucije ( $\log D$ ). Koeficijent distribucije ( $D$ ) definiše se kao odnos koncentracije jedinjenja u lipidnoj fazi i koncentracije svih neutralnih i jonizovanih vrsta u vodenoj fazi pri datoj vrednosti pH. Aproksimativno, kada je jedinjenje većinom nejonizovano, tada je  $\log D \approx \log P$  (Dabrovska i sar., 2011).

Vrednosti  $\log P$  ukazuju na ponašanje molekula u biološkom okruženju (Lemke, 2003):

- $\log P > 1$ , molekul je lipofilan;
- $\log P < -1$ , molekul je hidrofilan;
- $\log P = 0$ , molekul je jednako rastvorljiv u vodi i organskoj fazi;
- $\log P > 5$ , molekul je toksičan.

**Apsorpcija.** Mogućnost predviđanja apsorpcije jedinjenja kroz gastro-intestinalnu barijeru najvažniji je rezultat u selekciji novih jedinjenja kao farmaceutskih agenasa za oralnu primenu. Nedovoljnom apsorbcijom smanjuje se bioraspoloživost jedinjenja. Pasivna difuzija odigrava se između spojeva ćelija (paracelularni transport) ili kroz citoplazmu (trancelularni transport). Lipofilni molekuli lako prolaze kroz ćelijsku membranu i citoplazmu i stižu u krvotok i na ciljano mesto delovanja. Posledica previsoke lipofilnosti jeste slaba rastvorljivost supstance i nekompletna apsorpcija nakon oralne administracije što dovodi do smanjenja bioraspoloživosti jedinjenja. Ćelijske membrane su relativno nepropusne za hidrofilna jedinjenja i ona se transportuju uglavnom paracelularnim putem. Ova jedinjenja imaju veći afinitet za vezivanje plazma-protein i lako prolaze kroz krvno-moždanu barijeru.

Opšte merilo za optimalnu gastrointestinalnu apsorpciju jedinjenja pasivnom difuzionom propustljivošću (permeabilnost) nakon oralnog doziranja jeste da ima umeren  $\log P$  (opseg 0–3) kako je prikazano na *Slici 2.7*. U tom opsegu postoji dobra ravnoteža između propustljivosti i rastvorljivosti jedinjenja. Jedinjenja sa manjim  $\log P$  su polarnija i imaju slabiju permeabilnost kroz lipidni dvosloj (bisloj), dok su jedinjenja sa većim  $\log P$  nepolarnija i slabo se rastvaraju u vodi (Kerns i Di, 2008).



Slika 2.7. Hipotetički primer uticaja  $\log P$  na oralnu bioraspoloživost za seriju jedinjenja (Kerns i Di, 2008)

Uticaj  $\log D_{7,4}$ , odnosno koeficijenta distribucije pri pH 7,4 na osobine lekovitih supstanci prikazan je u Tabeli 2.3.

Vezu između lipofilnosti molekula i prolaska kroz krvno-moždanu barijeru, BBB utvrdio je Waterhouse (2003). Prema tom istraživanju smanjenje moždane ekstrakcije lipofilnijih jedinjenja u vezi je sa povećanjem nespecifičnog vezivanja za proteine plazme. Polarnija jedinjenja mogu biti takođe izložena P450 metabolizmu, što vodi bržem izlučivanju. Veoma polarna jedinjenja dobro se rastvaraju u vodi, ispoljavaju brže izlučivanje kroz bubrege i često sadrže jonizujuće funkcionalne grupe koje ograničavaju BBB penetraciju.

**Distribucija.** Nakon apsorpcije lek se reverzibilno vezuje za proteine plazme ili proteine seruma (human serum albumin-HSA,  $\alpha_1$ -kiseli glikoprotein, itd.). Láznicek i Láznickova (1995) utvrdili su za grupu anjonskih droga da se vezivanje za proteine plazme i akumulacija u ćelijama krvi povećava sa povećanjem lipofilnosti. Pored toga, odnos protein vezana-slobodna droga je proporcionalan lipofilnosti jedinjenja. Varshney (2010) je takođe zaključio da vezivanje protein-plazma zavisi od lipofilnosti molekula.

**Metabolizam i ekskrecija.** Jedinjenje uneto u organizam podleže biotransformaciji i kasnije eliminaciji jetrom ili bubrežnom ekskrecijom. Lipofilnija jedinjenja izložena su metaboličkim enzimima (citohrom P450 u intestinalnim epitelalnim ćelijama) što dovodi do većeg klirensa (van de Waterbeemd i sar., 2001).



Tabela 2.3. Uticaj  $\log D_{7,4}$  na osobine lekovitih supstanci (Kerns, Di, 2008)

Log $D_{7,4}$	Uticaj na osobine lekovite supstance	Uticaj <i>in vivo</i>
< 1	Rastvorljivost <i>velika</i>	Zapremina distribucije <i>mala</i>
	Permeabilnost <i>mala</i> pasivnom transcelularnom difuzijom	Oralna apsorpcija i BBB <sup>2</sup> penetracija <i>nepovoljne</i>
	Permeabilnost <i>moгуća</i> preko paracelularne difuzije ako je MW <sup>1</sup> < 200	Bubrežno izlučivanje <i>može biti visoko</i>
	Metabolizam <i>slab</i>	
1 – 3	Rastvorljivost <i>umerena</i>	Zapremina distribucije <i>uravnotežena</i>
	Permeabilnost <i>umerena</i>	Oralna apsorpcija i BBB penetracija <i>povoljne</i>
	Metabolizam <i>slab</i>	
3 – 5	Rastvorljivost <i>slaba</i>	Oralna bioraspoloživost <i>umerena do slaba</i>
	Permeabilnost <i>visoka</i>	Oralna apsorpcija <i>promenljiva</i>
	Metabolizam <i>umeren do visok</i>	
> 5	Rastvorljivost <i>slaba</i>	Zapremina distribucije <i>velika</i>
	Permeabilnost <i>visoka</i>	Oralna apsorpcija <i>nepovoljna i promenljiva</i>
	Metabolizam <i>odličan</i>	

<sup>1</sup>MW – molekulska masa (eng. *Molecular weight*); <sup>2</sup>BBB – krvno-moždana barijera (eng. *Blood-brain barrier*)

**Toksičnost.** Prilikom ispitivanja veze između podeonog koeficijenta oktanol-voda ( $\log P$ ) i toksičnosti nekih lokalnih anestetika Nava-Ocampo i Bello-Ramirez (2004) utvrdili su da se toksičnost bitno povećava pri  $\log P$  približno 3,0 zbog raspoloživosti ovih jedinjenja u plazmi i previsokog transfera kroz plazmu u centralni nervni sistem gde se delovanje produžava. Istraživanja novih i poznatih žučnih kiselina pokazala su da je veza između citotoksičnosti i lipofilnosti jedinjenja kompleksna i verovatno indirektna (Sharma i sar., 2010).

Lipofilnost molekula je jedan od faktora koji je uključen u „pravilo od 5“ Lipinskog (Lipinski i sar., 2001) i „pravila palca“ Clarka (2003) što je pokazano u poglavlju 2.2.1.

S obzirom na to da je lipofilnost jedinjenja izuzetno značajna osobina koja ima glavni uticaj na ADMET osobine i u direktnoj je vezi sa mogućnošću transporta kroz biološke membrane, za određivanje  $\log P$  razvijeno je više metoda. Naime, ovaj parametar može se odrediti eksperimentalno ili izračunati različitim softverskim paketima, tzv. *in silico* metodama (Tetko i sar., 2001; Tetko i sar., 2009; Mannhold i sar., 2009; Kujawski i sar., 2012). Standardna metoda za određivanje  $\log P$  jeste metoda mućkanja „shake-flask“

zasnovana na određivanju koncentracija rastvorenih supstanci u svakoj fazi smeše voda-organski rastvarač nakon uspostavljanja ravnoteže. Koriste se i druge metode kao što su potencijometrija, centrifugalna podeona hromatografija, kapilarna elektroforeza i naročito tečna hromatografija (Kerns i Di, 2008; Dabrowska i sar., 2011; Martel i sar., 2016).

#### 2.2.2.1. Hromatografska lipofilnost

Veoma pogodna metoda za određivanje parametra lipofilnosti  $\log P$  jeste tečna hromatografija na obrnutim fazama, RP-LC s obzirom na to da su ova analiza i raspodela *I*-oktanol/voda energetski analogni. Od 1980. godine u naučnoj literaturi postoji veliki broj publikacija koje prikazuju značajnu korelaciju reverzno-fazne hromatografske retencije i lipofilnosti jedinjenja izražene koeficijentom raspodele (npr. Ayouni i sar., 2005; Tuzimski i Sztanke, 2005; Gocan i sar., 2006; Giaginis i Tsantili-Kakoulidou, 2007; Henchoz i sar., 2008; Perušković i sar., 2014; Liang i Lian, 2015; Andrić i Héberger, 2015a; 2015b; Marcinić i sar., 2016). U tu svrhu koriste se i reverzno-fazna tankoslojna hromatografija, RP-TLC i reverzno-fazna hromatografija pod visokim pritiskom odnosno visokih performansi, RP-HPLC. Pokretna faza je smeša voda-organski rastvarač (najčešće metanol ili acetonitril), a nepokretna faza je najčešće C-18. Ovim hromatografskim metodama indirektno se određuje  $\log P$  ili se lipofilnost molekula definiše preko retencionih parametara (Nasal i sar., 2003; Mázak i sar., 2003; Valkó, 2004; Guillot i sar., 2009; Dabrowska i sar., 2011; Perišić-Janjić i sar., 2011; 2013; Rutkowska i sar., 2013; Perušković i sar., 2014; Milošević i sar., 2014a; 2014b; Martel i sar., 2016; Jevrić i sar., 2017; Karadžić i sar., 2017).

#### Tankoslojna hromatografija

Najpopularniji deskriptor lipofilnosti određen tankoslojnom hromatografijom jeste  $R_M$  (npr. Đaković-Sekulić i sar., 2005; Vaštag i sar., 2011; Perišić-Janjić i sar., 2011; 2013; Milošević i sar., 2013; 2014a; 2014b) izveden iz retencionog faktora  $R_f$  prema sledećem izrazu:

$$R_M = \log \left( \frac{1}{R_f} - 1 \right) \quad (2.2)$$

gde je  $R_f$  (eng. „retardaction factor“) odnos pređenog puta jedinjenja i puta rastvarača.

Veza između  $R_M$  vrednosti i zapreminskog udela organskog rastvarača u pokretnoj fazi voda-organski rastvarač ( $\varphi$ ), je linearna prema jednačini Soczewiński-Wachtmeistera (1962):

$$R_M = R_M^o + s\varphi \quad (2.3)$$

gde je  $R_M^o$  (odsečak) vrednost  $R_M$  ekstrapolirana na  $\varphi=0$ , odnosno retencija jedinjenja u čistoj vodi (dobija se određivanjem retencionog parametra u 3–5 različitih koncentracija organske faze ( $\varphi$ ) u pokretnoj fazi);  $s$  je nagib linearne veze prikazane grafički, koji u najvećoj meri zavisi od karakteristika ispitivane supstance i njene hemijske strukture. Regresionu jednačinu (2.3), izvedenu za pojedina jedinjenja, karakterišu različiti nagibi, koji znače da promene u sastavu pokretne faze imaju različite uticaje na  $R_M$  vrednosti i da nagibi ( $s$ ), koreliraju sa jačinom elucije organskog rastvarača.

Istrživanja Oros i Cserhádi (2010), Sârbu i sar. (2008), Perišić-Janjić i sar. (2011; 2013), Milošević i sar. (2014a; 2014b) ukazala su na to da se i nagib  $s$  iz jednačine 2.3. može koristiti kao alternativni parametar lipofilnosti.

#### *Reverzno-fazna hromatografija pod visokim pritiskom*

Retencija jedinjenja u RP-HPLC u mnogo prikazanih radova zasnovana je na izokratskim merenjima i izražava se retencionim faktorom  $k$ , koji je jednak:

$$k = \frac{t_R - t_o}{t_o} \quad (2.4)$$

gde je  $t_R$  retenciono vreme jedinjenja a  $t_o$  tzv. „mrtvo” retenciono vreme određeno injektovanjem markera koji se ne zadržava u nepokretnoj fazi (Kaliszan, 2007; Didaoui i sar., 1999) ili se uzima retenciono vreme prvog signala (pika) na hromatogramu (Cirera-Domènech i sar., 2013).

Veza između retencionog koeficijenta jedinjenja ( $\log k$ ) i zapreminskog udela organskog rastvarača  $\varphi$  u pokretnoj fazi voda-organski rastvarač je linearna i izražena dobro poznatom Soczewinski-Snyderovom jednačinom (Soczewiński i Wachtmeister, 1962; Snyder i sar., 1979):

$$\log k = \log k_o + S\varphi \quad (2.5)$$

gde je  $\log k_o$  (ili  $\log k_w$ ) ekstrapolirana vrednost kada je  $\varphi=0$ , odnosno to je retencija jedinjenja u čistoj vodi, a  $S$  je nagib linearne veze i konstanta je za dati analit i HPLC sistem.

Kao lipofilni parametri jedinjenja mogu se koristiti retencioni podaci  $\log k$  (Kovačević i sar., 2016; Jevrić i sar., 2017),  $\log k_o$  i  $S$ , ali se najčešće koristi  $\log k_o$ , pošto se pokazao kao bolji prediktor podeonog koeficijenta  $\log P$  (npr. Valkó, 2004; Guillot i sar., 2009; Perišić-Janjić i sar., 2011; Rutkowska i sar., 2013; Martel i sar., 2016; Valko, 2016; Karadžić i sar., 2017):

$$\log P = a + b \log k_o \quad (2.7)$$

gde su  $a$  i  $b$  linearni regresioni koeficijenti.

Uputstvom Organizacije za ekonomsku saradnju i razvoj, OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) predložen je ekstrapolirani retencioni faktor  $\log k_o$  za određivanje lipofilnosti jedinjenja (Harnisch i sar., 1983).

Valkó i Slégel (1993) su predložili novi hromatografski indeks hidrofobnosti  $\varphi_o$ , kao merilo lipofilnog karaktera jedinjenja u RP-HPLC, koji je pokazao bolju korelaciju sa  $\log P$  vrednosti nego  $\log k_o$ :

$$\varphi_o = -\frac{\log k_o}{S} \quad (2.6)$$

Ovaj parameter nazvan je hromatografski indeks hidrofobnosti, CHI (eng. *Chromatographic Hydrophobicity Index*) i u linearnoj korelaciji je sa  $\log P$  (Valkó, 2016; Subirats i sar., 2016 ).

Lombardo i sar. (2000; 2001) utvrdili su da je podeoni koeficijent oktanol-voda pri pH 7,4,  $\log D_{oct}^{7,4}$ , označen kao  $E\log D_{oct}$ , značajan parametar za određivanje  $\log P_{oct}$  neutralnih i baznih jedinjenja.

### 2.3. Veze između strukture i osobina jedinjenja – hemometrijska analiza

Savremena istraživanja u razvoju lekova uključuju analizu zavisnosti između strukture i aktivnosti jedinjenja, SAR analiza (eng. *Structure-Activity Relationship*). Brojne studije doprinele su razvoju kvantitativnih zavisnosti između strukture i fizičko-hemijskih karakteristika, QSPR analiza (eng. *Quantitative Structure Property Relationship*), (Liu i sar., 2001; Kawczak i sar., 2015, Hosamani i sar., 2017), strukture i biološke aktivnosti jedinjenja, QSAR analiza (Hansch, 1969; Dearden, 1994; Murugan i sar., 1994; Todeschini i Gramatica, 1998) i strukture i retencionog (hromatografskog) ponašanja jedinjenja, QSRR (Kaliszan, 1987; 1997; 2000; 2007; Lopez-Grio i sar., 2000; Al-Haj i sar., 2001; Heberger, 2007). Ove

analize omogućavaju izvođenje prediktivnih modela odabirom, kombinovanjem i klasifikovanjem velikog broja *in silico* molekulskih deskriptora koji numerički karakterišu strukturu ispitivanih jedinjenja (npr. Tosti i sar., 2012; Jitender i sar., 2013; Jevrić i sar., 2017; Karadžić i sar., 2017; Prachayasittikul i sar., 2017; Zare i sar., 2017).

### 2.3.1. QSAR analiza

Osnovna pretpostavka QSAR analize jeste da se promene u biološkoj aktivnosti serije hemijskih jedinjenja koja imaju zajednički mehanizam delovanja koreliraju sa razlikama u njihovim strukturnim, fizičkim i hemijskim osobinama (Johnson i Maggiora, 1990). QSAR modelovanje uključuje tri koraka: (1) sakupljanje, ili ako je moguće, kreiranje test seta jedinjenja; (2) izbor deskriptora koji mogu tačno povezati hemijsku strukturu sa biološkom aktivnošću; (3) primena statističkih metoda koje koreliraju promene u strukturi sa promenama u biološkoj aktivnosti.

Glavna prednost QSAR metoda je mogućnost predviđanja osobina hemijskih jedinjenja koja još nisu sintetisana i ispitana *in vitro* i/ili *in vivo* eksperimentima. Izvodi se kao dvodimenzionalna, 2D-QSAR i todimenzionalna, 3D-QSAR analiza (Cramer i sar., 1988; Klebe i sar., 1994; Perkins i sar., 2003; Yang i sar., 2012; Vilar, Costanzi, 2012; Jitender i sar., 2013; Almi i sar., 2014; Kwon i sar., 2014; Pathan i sar., 2016; Xu i sar., 2016). U 2D-QSAR analizi koriste se molekulski deskriptori izračunati na osnovu 2D topologije molekula, a 3D-QSAR analize zasnovane su na molekulskim osobinama koje zavise od 3D strukture molekula. 2D-QSAR metodom analiziraju se promene supstituenata na delu molekula koji je istovetan za sve članove ispitivane serije molekula, dok 3D-QSAR korelira prostorno lokalizovane hemijske osobine serije jedinjenja sa biološkom aktivnošću (Perkins i sar., 2003).

U literaturi se u nazivu QSAR metode nekada naglašava specifična karakteristika koja se predviđa, npr. QSAAR (engl. *Quantitative Structure-Antioxidant Activity Relationship*) za predviđanje antioksidativne aktivnosti jedinjenja (Farkas i sar., 2004), QRAR (engl. *Quantitative Retention-Activity Relationship*) za predviđanje biološke aktivnosti na osnovu retencionih parametara (Wang i sar., 2010), QSTR (engl. *Quantitative Structure-Toxicity Relationship*) za predviđanje toksičnosti (Can, 2014), QSP<sub>k</sub>R ili QSPKR (engl. *Quantitative Structure-Pharmacokinetic Relationship*) za predviđanje farmakokinetičkih osobina (Reeta i sar., 2014).

### 2.3.1.1. 3D-QSAR analiza

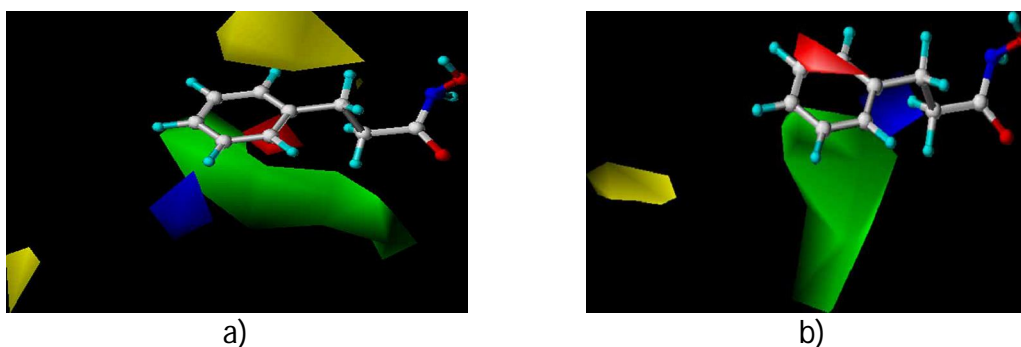
3D-QSAR CoMFA (eng. *Comparative Molecular Field Analysis*), (Cramer i sar., 1988) i CoMSIA (eng. *Comparative Molecular Similarity Index Analysis*), (Klebe i sar., 1994) tehnike koriste se za formiranje statističkih i grafičkih modela aktivnosti na osnovu molekulske strukture sa ciljem tačnih predviđanja aktivnosti netestiranih jedinjenja. CoMFA i CoMSIA zasnivaju se na predstavljanju liganada putem molekulskih polja izmerenih u prostoru koji ih okružuje. U ovaj tip analize ugrađen je znatan set fizičko-hemijskih deskriptora - strukturni, konformacioni, geometrijski, elektronski i termodinamički.

**CoMFA.** Za konstrukciju CoMFA modela neophodna su jedinjenja sa poznatom aktivnošću (test set) koja se prvo svrstavaju zajedno, obično na osnovu sličnosti u strukturi. Svrstani molekuli tada se ugrađuju u 3D mrežu, nakon čega se sterna i elektrostatička polja izračunavaju za svako jedinjenje i za svaku tačku mreže kojom su okruženi molekuli. Razlike u ovim sternim/elektrostatičkim poljima tada se dovode u korelaciju sa razlikama u eksperimentalno određenoj biološkoj aktivnosti. CoMFA koristi Lenard-Džons (Lennard-Jones) i Kulonove (Coulomb) potencijale za računanje energija sternog i elektrostatičkog polja. Mogu se koristiti i druga polja posebno ili u kombinaciji sa standardnim CoMFA poljima (Perkins i sar., 2003).

**CoMSIA.** U ovoj analizi, pored sternih i elektrostatičkih efekata, koriste se i uticaj hidrofobnih i vodoničnih veza na energiju polja. Deskriptori polja iz CoMFA zamenjuju se u CoMSIA deskriptorima koji prepoznaju prostornu različitost/sličnost svrstanih molekula. Sličnost molekula procenjuje se preko sličnosti svakog molekula u setu podataka sa zajedničkim atomom (*probe atom*) koji predstavlja određeni tip osobine (npr. sterna, elektrostatička, vodonična veza). Kada se porede CoMSIA i CoMFA korišćenjem nekoliko setova podataka, dobijeni su slični statistički rezultati za oba pristupa. Međutim, za razliku od Lenard-Džonsovog potencijala koji se koristi u CoMFA, Gaus-ova funkcija (Gaussian) koja se koristi u CoMSIA ima neprekidnu vrednost za interakciju kojom je molekul okružen. Shodno tome, obojeni konturni grafici dobijeni CoMSIA analizom mogu biti biološki značajniji (Klebe i Abraham, 1999).

Analiza parcijalnih najmanjih kvadrata, PLS (eng. *Partial Least Squares*) koristi se za izbor najboljeg modela linearne korelacije CoMFA i CoMSIA polja sa biološkom aktivnošću ( $pIC_{50} = -\log IC_{50}$ ) jedinjenja.

Na *Slici 2.8* prikazani su primeri CoMFA i CoMSIA konturnih grafika.



Slika 2.8. a) CoMFA i b) CoMSIA konturni grafik za sterno i elektrostatičko polje (Haq i sar., 2009)

*Zeleno* – sterno favorizovane površine; *žuto* – sterno nefavorizovane površine; *plavo* – površine gde pozitivno naelektrisanje grupe povećavaju aktivnost; *crveno* – površine gde negativno naelektrisanje grupe povećavaju aktivnost

### 2.3.2. QSRR analiza

Vrlo značajna hemometrijska metoda je QSRR, koja kvantifikuje zavisnost između hromatografskog ponašanja ispitivanih molekula i njihove molekulske strukture iskazane preko molekulskih deskriptora (Kaliszan, 1987; 1997; 2000; 2007; Lopez-Grio i sar., 2000; Al-Haj i sar., 2001; Heberger, 2007). Naime, da bi se pratio uticaj okruženja na ponašanje molekula koriste se njegove hromatografske retencione osobine. QSRR analiza je veoma zastupljena u savremenoj naučnoj literaturi (Ghasemi i Saaidpour, 2009; Noorizadeh i sar., 2012; Turkö i sar., 2012; Kovačević i sar., 2013; Goriňsky, 2013; Hanai, 2014; Milošević i sar., 2014; Karadžić i sar., 2015; Jevrić i sar., 2017; Karadžić i sar., 2017). QSRR omogućava predviđanje retencionih podataka novih još nesintetizovanih jedinjenja, fizičkih osobina, npr. *1*-oktanol/voda podeoni koeficijenti ( $\log P$  vrednosti), razjašnjenje retencionog mehanizma, optimizaciju razdvajanja složenih smeša, karakterizaciju pokretnih i nepokretnih faza ili kreiranje eksperimenata (Héberger, 2007; Hanai, 2014; Kovačević i sar., 2013; 2015; Karadžić i sar., 2015; Jevrić i sar., 2017).

### 2.3.3. Statistički pristupi u QSAR i QSRR analizama

Za QSAR i QSRR ispitivanja, koriste se komercijalni kompjuterski programi za izračunavanje molekulskih deskriptora i klasifikacione i regresione hemometrijske tehnike (Liu i Long, 2009; Dehmer i sar., 2012). Klasifikacionim tehnikama utvrđuje se sličnost ili razlika između jedinjenja, ili između uzoraka i otkrivaju se određene pravilnosti među podacima. Regresione tehnike služe za analizu povezanosti između zavisno i nezavisno

promenljivih i omogućavaju definisanje regresionih koeficijenata i evaluaciju statističke vrednosti pretpostavljenog regresionog modela.

Primena QSAR i QSRR modela zavisi od statističke značajnosti i predikcione sposobnosti ovih modela. Za validaciju QSAR modela, razvijenih višestrukom (multiplom) linearnom regresijom (MLR) i metodom parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS) koriste se interna i eksterna validacija iskazane preko više parametara validacije. Opšti metod za internu validaciju QSAR modela je *cross*-validacija trening seta jedinjenja. *Eksterna* validacija izvodi se sa test setom jedinjenja.

U ovom radu od klasifikacionih tehnika korišćena je klaster analiza, CA (eng. *Cluster Analysis*) a od regresionih linearna regresija (LR), kvadratna funkcija, višestruka linearna regresija (MLR) i regresija metodom parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS) koje će ukratko, kao i parametri validacije, biti objašnjene u Poglavlju 3.

#### 2.3.4. Molekulski deskriptori

Molekulski deskriptori na odgovarajući način predstavljaju strukturu molekula. Već nekoliko decenija, naučnici se bave istraživanjima mogućnosti pronalaženja načina za „prevođenje“ informacija sadržanih u molekulskoj strukturi jedinjenja u brojčane vrednosti koje se mogu koristiti za definisanje veze između strukture i biološke aktivnosti, ili između strukture i drugih eksperimentalno određenih osobina. Molekulski deskriptori predstavljaju konačan rezultat logičke i matematičke procedure, kojom se hemijska informacija sadržana u molekulskoj strukturi prevodi u numeričku vrednost (Todeschini i Consonni, 2000).

Prema prirodi osobina koje opisuju molekulski deskriptori se dele na: fizičko-hemijske, topološke, kvantno-hemijske i biološke.

*Fizičko-hemijski deskriptori* (npr.  $\log P$  (lipofilnost), rastvorljivost, temperatura topljenja, zapremina molekula) karakterišu osobine celog molekula jednom vrednošću. Od ovih deskriptora najčešće se koristi  $\log P$ , deskriptor lipofilnosti molekula izražen kao logaritam podeonog koeficijenta,  $P$  za sistem 1-oktanol-voda,  $\log P_{oct}$  (Sangster, 1989).

*Topološki deskriptori* su tip deskriptora koji se računaju na osnovu molekulskih grafova hemijskih jedinjenja. Ovi deskriptori uključuju dobro poznate klasične molekulske parametre kao što su Randićev indeks, Viner (Wiener) indeks, Balaban indeks i drugi.

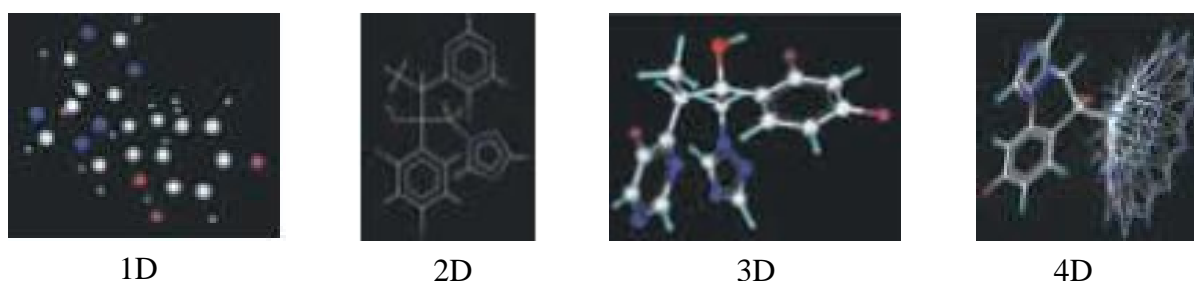
*Kvantno-hemijski deskriptori* generišu širok opseg elektronskih i geometrijskih osobina molekula i njihove međusobne interakcije (Karelson i sar., 1996). Primeri ovih deskriptora su: gustine atomskog naelektrisanja, energije najviših zauzetih orbitala, HOMO



(eng. *Highest Occupied Molecular Orbitals*), energije najnižih slobodnih molekulskih orbitala, LUMO (engl. *Lowest Unoccupied Molecular Orbitals*), nukleofilna i elektrofilna super-delokalizabilnost, molekulski elektrostatički potencijali, MEP (engl. *Molecular Electrostatic Potentials*) i polja, MEF (engl. *Molecular Electrostatic Fields*), dipolni moment (Todeschini i Consonni, 2000).

U zavisnosti od prikaza molekula izvode se sledeći molekulski deskriptori (Terfloth 2003): bezdimenzionalni (0D), jednodimenzionalni (1D), dvodimenzionalni (2D), trodimenzionalni (3D), četvorodimenzionalni (4D). 0D deskriptori izvedeni su iz formule molekula (npr. vrsti i broju atoma u molekulu, molekulsku masu, itd.); 1D uključuju informacije o prisustvu funkcionalnih grupa, prstena, hemijskih veza i dr.; 2D (topološki) deskriptori sadrže informacije o povezivanju atoma u molekulu, dužine veza, uglove veza, itd. i računaju se na osnovu dvodimenzionalnog prikaza molekula (elektrostatički i kvantno-hemijski deskriptori, geometrijski i dr.); 3D (topografski) deskriptori, kao što su molekulsku površina, molekulsku zapreminu, momenat inercije, itd., zavise od geometrijske strukture molekula, odnosno od 3D koordinata strukture i ponekad se nazivaju prostorni deskriptori (npr. površina molekula, zapremina molekula i druge geometrijske osobine), (Dudek i sar., 2006). Tu su različiti tipovi 3D deskriptora npr. elektronski, sterni i dr.; 4D molekulski deskriptori (energetski deskriptori) opisuju molekul u trodimenzionalnom prostoru i interakcije sa atomima (atomske grupama) koje ga okružuju i kao rezultat dobija se vektorsko polje energetskih interakcija u rešetki koja karakteriše molekul (Hopfinger i sar., 1997).

Na *Slici 2.9* prikazani su tipovi molekulskih deskriptora zasnovani na dimenzionalnosti.



*Slika 2.9.* Tipovi molekulskih deskriptora zasnovani na dimenzionalnosti

*Biološki ili ADMET deskriptori* opisuju biološke osobine jedinjenja vezane za njegovu apsorpciju, distribuciju, metabolizam, izlučivanje (ekskreciju) i toksičnost. Ovu grupu deskriptora čine:

- *Deskriptori oralne intestinalne absorpcije* izraženi preko intestinalne permeabilnosti humanih epitelnih ćelija kolorektalnog adenokarcinoma (Caco-2) i Madin Darby epitelnih ćelija psećeg bubrega, MDCK (eng. *Madin Darby Canine Kidney*), (van Breemen i Li, 2005; Obringer i sar., 2016; Irvin i sar., 1999; Volpe, 2011);
- *Deskriptor absorpcije u gastrointestinalnom traktu, HIA* (eng. *Human Intestinal Absorption*), (Wessel i sar., 1988);
- *Deskriptor prolaska kroz krvno-moždanu barijeru, BBB* (Liu i sar., 2001; Hou i Xu, 2003; Cecchelli i sar., 2007);
- *Deskriptor vezivanja za proteine krvne plazme, PPB%* (eng. *Plasma Protein Binding*), Wang i sar., 2006);
- *Deskriptori inhibicije, indukcije ili aktivacije određenih enzima i vezivanja za određene receptore*: EI-inhibicija enzima, KI-inhibicija kinaze, PI-inhibicija proteaze, GPCR (engl. *G protein-coupled receptor*) – vezivanje za G-protein spregnuti receptor, NRL (engl. *Nuclear Receptor Ligand*) – vezivanje za nuklearni receptor, ICM (engl. *Ion Channel Modulators*) – modulacija jonskih kanala i dr. (I-Lab 2.0).
- *Deskriptori toksikoloških doza jedinjenja, LD<sub>50</sub>* (Letal Dose 50%, mg/kg telesne mase), *LC<sub>50</sub>* (Letal Concentration 50, mg/L), *EC<sub>50</sub>* (Median Effective Concentration, mg/L) i dr. (<http://www.chemsafetypro.com>) i *in silico* toksikologija (Raies i Bajic, 2016).

## 2.4. Dizajn lekova

Dizajn lekova je proces nalaženja novih lekova zasnovan na poznavanju biološke mete. Terapeutski efekat nekog leka (ligand) postiže se njegovom interakcijom sa proteinom čime se aktivira ili inhibira određena funkcija proteina (biološka meta, ciljano mesto ili eng. *target*). Biološka meta je protein, nukleinska kiselina, ili ćelijska membrana.

Vezivanjem aktivnog molekula za biološku metu može se: (i) promeniti njena konformacija čime se menja i njena funkcija (agonisti); (ii) sprečiti druge supstance (hormone) da se vežu za biološku metu, bez promene njene konformacije ili funkcije

(antagonisti, inhibitori, blokatori). Proteinske biološke mete su najčešće: enzimi, G protein-spregnuti receptori (GPCR), jonski kanali, membranski transporteri, nuklearni hormonski receptori, strukturni protein ([http://en.wikipedia.org/wiki/Drug\\_design](http://en.wikipedia.org/wiki/Drug_design)). Savremeni racionalni dizajn lekova često podrazumeva računarsko modelovanje

Razumevanje principa kojima mali molekuli liganda prepoznaju i interaguju sa makromolekulima je od velikog značaja u farmaceutskim istraživanjima i razvoju farmaceutika. Danas kompjuterske strategije, kao što su virtuelne skrining tehnike (VS) dozvoljavaju provere svih aspekata razvoja lekova (Meng i sar., 2011). Virtuelni skrining ili *in silico* skrining je metoda selekcije jedinjenja izračunavanjem njihovih bitnih osobina (visoka potentnost, povoljne farmakokinetičke osobine, minimalna toksičnost) primenom molekulskog modelovanja. VS može podrazumevati metode koje su zasnovane na ligandu (eng. *ligand-based*) i na strukturi (eng. *structure-based*).

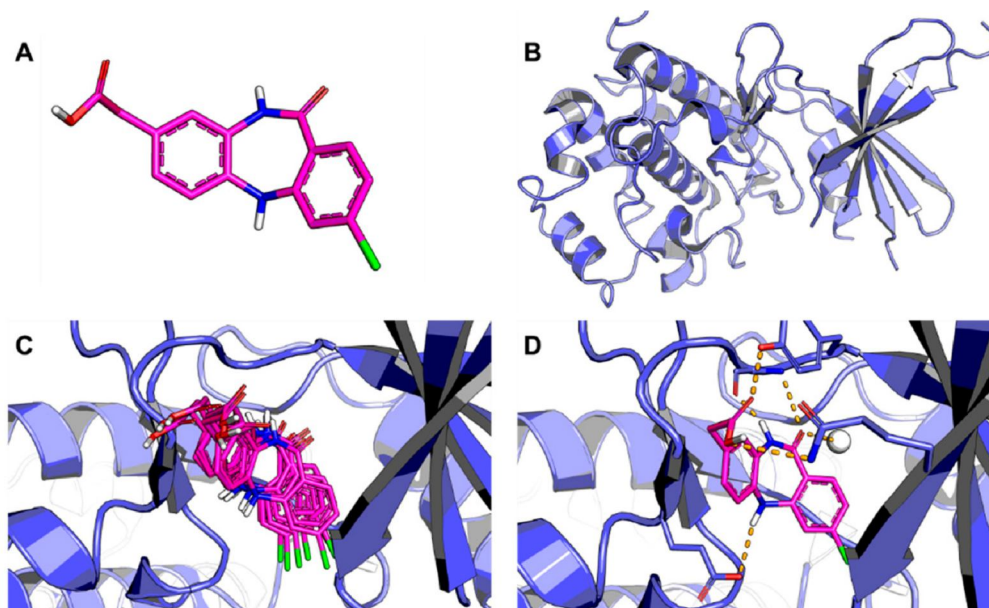
### 2.4.1. Molekulski doking

Najčešće korišćena VS metoda zasnovana na strukturi je molekulski doking (eng. *Molecular docking*). Doking je proces u kome se dva molekula vezuju u stabilan kompleks. Metode za doking predviđaju 3-dimenzionalne orijentacije molekula u doking procesu. Na osnovu prioritete orijentacije predviđa se jačina i afinitet vezivanja dva molekula. Od orijentacije dva interreagujuća molekula zavisi tip signala koji se proizvodi, tj. agonizam ili antagonizam. Dakle, cilj molekulskog dokinga je predviđanje strukture kompleksa ligand-biološka meta (receptor) korišćenjem kompjuterskih metoda (Vilar i Costanzi, 2011; Masand i sar., 2014; Abdulfatai i sar., 2017). Ovom metodom moguće je predvideti, sa značajnom tačnošću, konformaciju malih molekula liganda u aktivnom mestu ciljanog proteina (*Slika 2.10*), (Ferreira i sar., 2015).

Proces molekulskog dokinga ligand-protein zahteva dva osnovna koraka: (i) predviđanje konformacije liganda i njegovo pozicioniranje i orijentaciju unutar mesta vezivanja ciljanog proteina; (ii) procena afiniteta vezivanja, odnosno predviđanje energija interakcije sa svakom od predviđenih konformacija vezivanja (Kapetanovic, 2008). Ove konformacije se zatim rangiraju preko specifičnih *scoring* funkcija.

Predviđanje biološke aktivnosti jedinjenja na osnovu doking rezultata ne zahteva trening set liganada sa poznatom aktivnošću već se dobijeni rezultati direktno koriste za rangiranje relativnog prediktivnog afiniteta ispitivane serije jedinjenja. Međutim, apsolutni uslov za molekulski doking i kasnije izračunavanje protein-ligand interakcija jeste da je struktura ciljanog proteina poznata, po mogućstvu eksperimentalno određena. Proteini ili

nukleinske kiseline čija je struktura određena eksperimentalno (difrakcijom X-zraka ili NMR spektroskopijom) deponovani su u Protein Data Bank, PDB ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)) i besplatno su dostupni akademskoj zajednici.



Slika 2.10. Shema procesa molekuskog dokinga (Ferreira i sar., 2015)

(A) Trodimenzionalna struktura liganda; (B) Trodimenzionalna struktura receptora; (C) Ligand je ušao u šupljinu vezivanja receptora i istražene su moguće konformacije; (D) Identifikovane su najverovatnija konformacija vezivanja i odgovarajuće intermolekuleke interakcije.

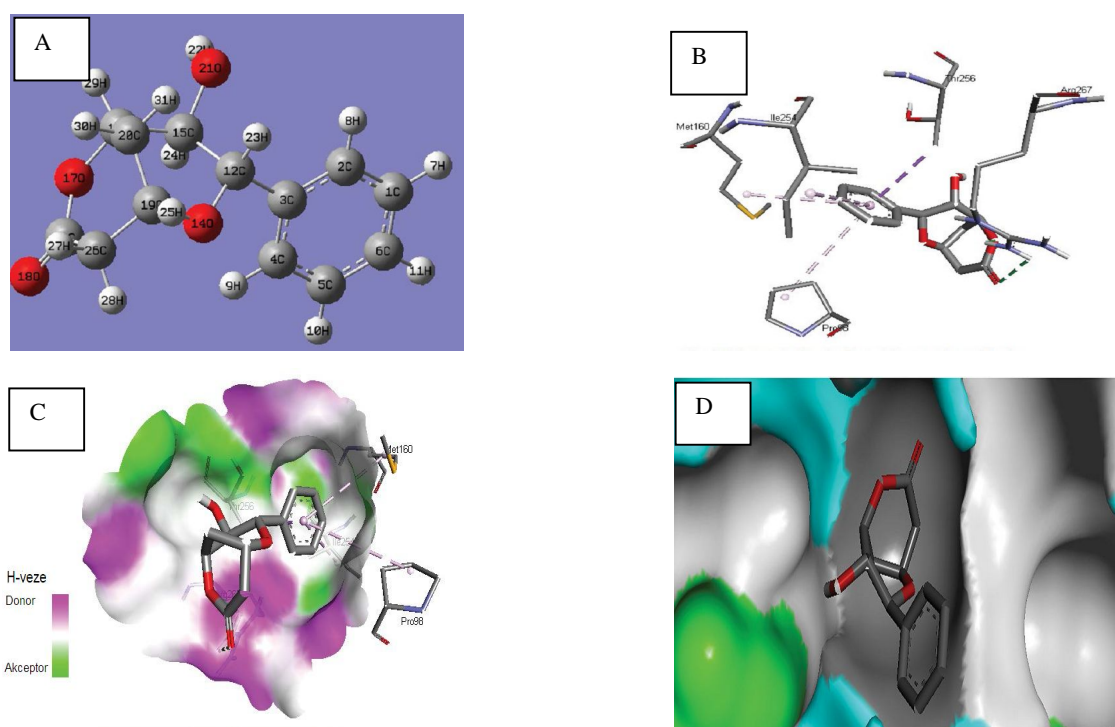
Osnova proteina – crta; štapići – ligand (crno u grimizno-ljubičastom) i aktivna mesta rezidua (crno u plavom); voda – bela sfera; vodonične veze – isprekidane linije

Počevši od 80-ih godina prošlog veka, kada je razvijen prvi algoritam, molekularni doking je jedna od osnovnih metoda u otkrivanju lekova (López-Vallejo i sar., 2011). Na primer, ispitivanja uključuju načine vezivanja liganda i odgovarajuće međumolekulske interakcije koje stabilizuju kompleks ligand-receptor. Nadalje, algoritmima molekuskog dokinga omogućena su kvantitativna predviđanja energetske vezivanja i rangiranje jedinjenja na osnovu afiniteta vezivanja kompleksa ligand-receptor (López-Vallejo i sar., 2011; Huang i Zou, 2010).

U savremenoj naučnoj literaturi opisani su brojni radovi vezani za primenu molekuskog dokinga u oblasti medicine, farmakologije, prehrambenog inženjerstva i dr. Posebno je značajan broj tih radova posvećen citotoksičnom delovanju različitih jedinjenja definisanjem veze ligand-protein. Recimo, molekulskim dokingom utvrđeno je da su derivati emodina snažni inhibitori enzima (PDB ID: 2PFR, PDB ID: 3NTG, PDB ID:1A35) koji su uzročnici kancera kolona i dojke (Shadrack i Ndesendo, 2017). *In silico* molekulskim dokingom izohinolinskih alkaloida ekstrahovanih iz *Erythrina poeppigiana* (Leguminosae)

objašnjena je značajna citotoksična aktivnost prema malignoj ćelijskoj liniji MCF-7, inhibicijom EGFR2 enzima (Herlina i sar., 2017). Novosintetizovani derivat kumarina (3E)-3-(4metilbenziliden)-3,4-dihidro-2H-hromen-2-on (MBCD) je veoma citotoksičan prema ćelijama MCF-7 kancera dojke i HT-29 kancera kolona zbog efikasnog vezivanja za aktivna mesta ciljanog enzima tankiraze (PDB ID: 4L2K) i interakcije sa reziduama amino kiselina u aktivnom centru (Beena i sar., 2017).

Međutim, iako je u brojnim publikacijama potvrđeno da pojedini stiril laktoni imaju submikro- i mikromolarnu citotoksičnost prema pojedinim linijama ćelija kancera (de Fatima i sar., 2006; Choo i sar., 2014, Benedeković i sar., 2014a; 2014b; Kovačević i sar., 2017), analiza molekuskog dokinga retko je korišćena za ispitivanje inhibitorne aktivnosti tih jedinjenja. Preliminarni rezultati molekuskog dokinga sa stiril laktonom 8-epi-9-deoksi goniopipiron pokazala su da ovo jedinjenje može ispoljiti inhibitornu aktivnost prema humanom mutantu p53 (PBD ID:4MZI) kako je prikazano na *Slici 2.11* (Sreelekshmi i sar., 2015). Mutanti p53 proteina su složene familije od nekoliko stotina proteina sa različitim osobinama i poznato je da se u visokom procentu ćelija tumora akumuliraju izoforme ovog proteina.

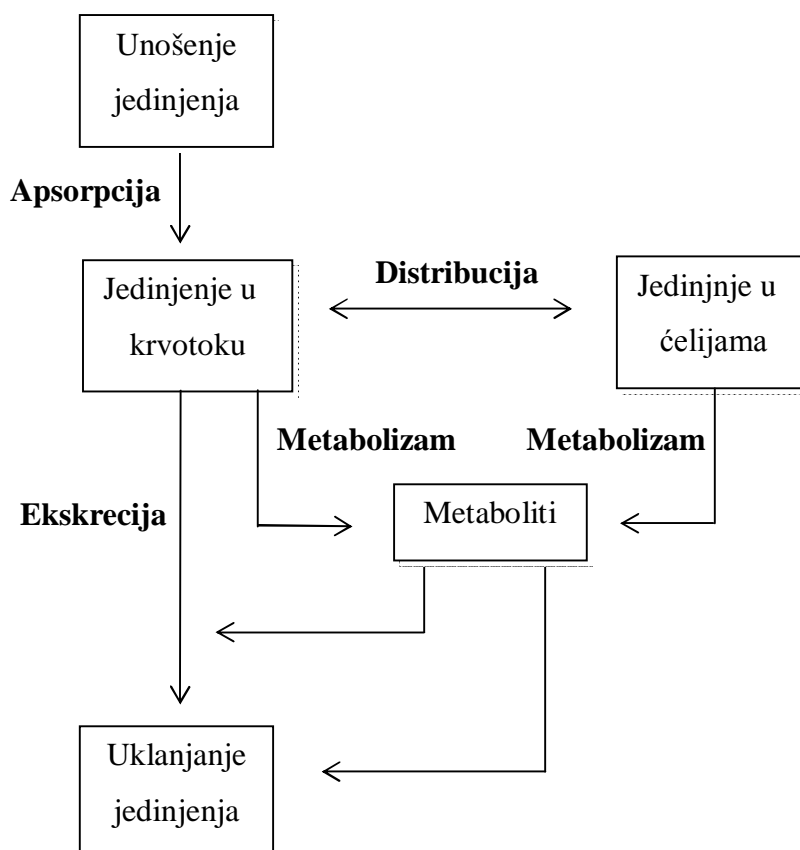


*Slika 2.11.* Molekulski doking 8-epi-9-deoksi goniopipirona (Sreelekshmi i sar., 2015)

- (A) Optimizovani geometrijski oblik 8-epi-9-deoksi goniopipirona; (B) Shema interakcije liganda sa aktivnim mestom humanog mutanta p53; (C) reprodukcija dokovane kristalne konformacije sa akceptorskom H-vezom (zeleno),  $\pi$ -alkil (ružičasto) i donorskom H-vezom (ljubičasto) površine receptora; (D) Izgled površine receptora sa dokiranim ligandom ugrađenim u aktivno mesto.

## 2.5. Farmakokinetika

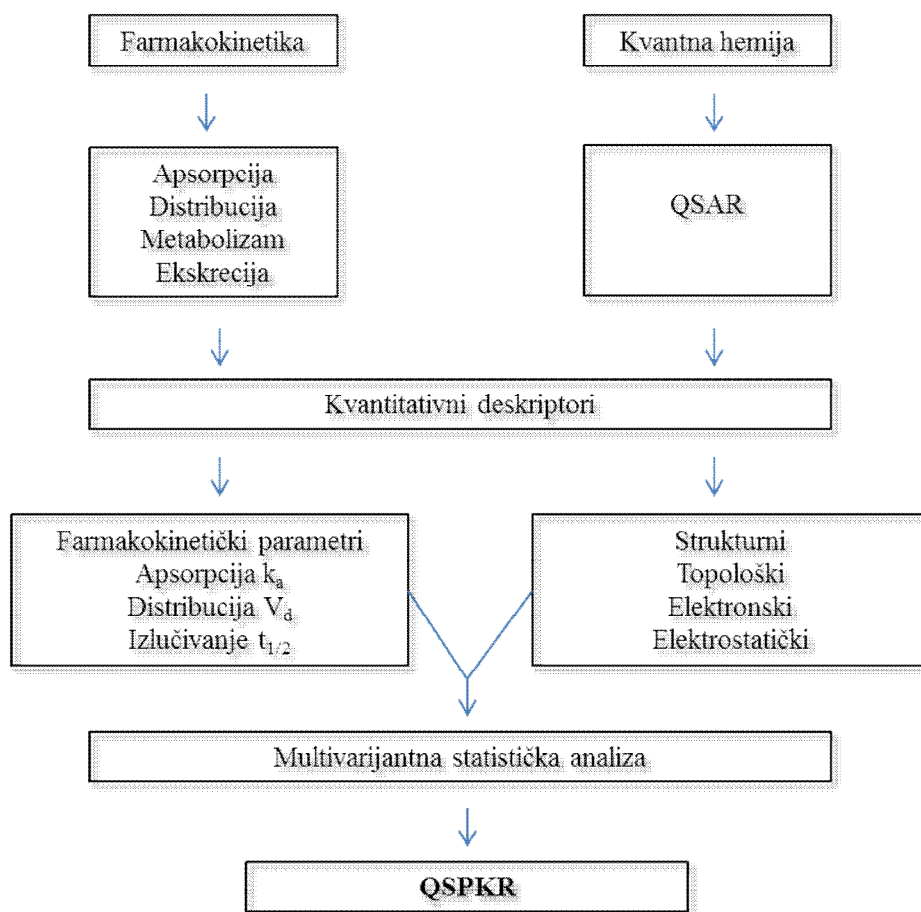
Farmakokinetika podrazumeva proučavanje procesa koji imaju uticaj na kretanje ksenobiotika (lekova) u organizmu. Nakon unosa stranog jedinjenja u organizam, moguća su četiri osnovna načina njegovog kretanja kroz organizam: **apsorpcija**, **distribucija**, **metabolizam** i **ekskrecija** (Slika 2.12). Zajednički naziv za ove procese je ADME procesi. Jedinjenje uneto u organizam prvo se *apsorbuje* u krvotok, potom se disperguje u ćelije i unutrašnje ćelijske fluide gde se može reverzibilno vezati za receptore. Ovaj proces naziva se *distribucija*. Dok se neki molekuli vezuju za receptore, oni koji ostaju slobodni mogu se vratiti u krvotok. Distribuirani molekuli su raspoloživi za hemijske promene, što se naziva *metabolizam*. Konačno, ksenobiotik i njegovi metaboliti izlučuju se iz organizma pomoću urina ili fecesa (*ekskrecija*). Metabolizam i ekskrecija su načini uklanjanja ksenobiotika iz organizma.



Slika 2.12. Osnovne putanje kretanja nekog jedinjenja i njegove modifikacije u organizmu, ADME procesi

Da bi se skratio put i cena otkrivanja i razvoja jedinjenja koja bi mogla da se upotrebe u terapijske svrhe koristi se *in silico* modelovanje kojim se može predvideti više karakteristika kao što su fizičko-hemijske, metaboličke, permeabilnost, transport, farmakokinetičke i zdravstvene. Poseban značaj ovog modelovanja je u predviđanju ADME osobina jedinjenja. Predviđanje ADME osobina uključena su u dva aspekta metoda modelovanja: modelovanje podataka i molekulsko modelovanje. Za molekulsko modelovanje koriste se molekulski mehanizmi, modelovanje farmakofora, molekulski doking i kvantna mehanika za ispitivanje potencijalnih interakcija između malih molekula i poznatih proteina koji učestvuju u ADME procesima, kao što je citohrom P450s. Za modelovanje podataka primenjuje se QSPR, odnosno QSPKR pristup (Hou i sar., 2006).

Postupci uključeni u QSPKR analizu ADME procesa dati su na *Slici 2.13*.



Slika 2.13. Postupci uključeni u QSPKR analizu ADME procesa

U otkrivanju farmaceutskih agenasa, razvoju i kliničkoj praksi kao i u *in silico* predviđanju ADME (apsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija) osobina jedinjenja koristi se više farmakokinetičkih parametara, npr. zapremina distribucije ( $V_d$ ), površina ispod krive zavisnosti koncentracija jedinjenja u krvi-vreme,  $AUC$  (eng. *Area Under the Curve*), brzina kojom se jedinjenje ekstrahuje iz krvotoka i eliminiše izlučivanjem,  $Cl$  (eng. *Clearance*), brzina kojom se koncentracija jedinjenja iz krvotoka smanjuje na polovinu, tzv. *poluvreme života* ( $t_{1/2}$ ), bioraspoloživost. Značajni farmakokinetički parametri su i konstanta absorpcije ( $k_a$ ), logaritam podeonog koeficijenta ( $\log BB$ ), vezivanje za proteine plazme,  $PPP$  (eng. *Plasma Protein Binding*), efektivna permeabilnost u jejunumu,  $P_{eff}$  (eng. *Effective Jejunal Permeability*).

### 2.5.1. Apsorpcija

Brojni su faktori koji utiču na apsorpciju jedinjenja u crevima. Među njima najznačajniji su otapanje i rastvorljivost. Povećanje otapanja se postiže smanjenjem veličine čestica, a povećanje rastvorljivosti uvođenjem rastvorljivijih funkcionalnih grupa.

Od ADME osobina, oralna apsorpcija je najintenzivnije ispitivana za *in silico* predviđanje bioaktivnosti jedinjenja. Intestinalna apsorpcija uključuje dve etape. U prvoj etapi molekuli jedinjenja rastvaraju se u vodi koju sadrži gastrointestinalni trakt. Rastvoreni molekuli tada se prenose kroz aktuelne barijere gastrointestinalnog trakta (jejunum, ileum) u krvotok. Pored barijera u gastrointestinalnom traktu, postoji i nekoliko drugih barijera koje su veoma značajne kao što su krvno-moždana barijera ( $BBB$ ) i *stratum corneum* kože. Posebno je interesantna krvno-moždana barijera koja odvaja mozak i centralni nervni sistem od krvotoka.

Glavni put za permeabilnost jedinjenja kroz barijeru jeste pasivna difuzija. Dva su tipa pasivne difuzije: paracelularni transport i transcelularni transport. Za hidrofobne molekule molarne mase ispod 200 favorizovan je paracelularni transport između spojeva ćelija, dok se lipofilni molekuli transportuju transcelularno (Hou i sar., 2006).

Za predviđanje bioaktivnosti jedinjenja *in silico* kao parametri oralne absorpcije koriste se: frakcija doze jedinjenja apsorbovana u organizmu,  $FA\%$  (Zhao i sar., 2002; Hou i sar., 2006; Linnankoski i sar., 2008), Caco-2 ćelijski sistem i Madin Darby epitelne ćelije psećeg bubrega, MDCK (van Breemen i Li, 2005; Obringer i sar., 2016; Irvin i sar., 1999; Volpe, 2011, revijalni prikaz u Hou i sar., 2006), efektivna intestinalna membranska permeabilnost u jejunumu ( $P_{eff}$ ), konstanta absorpcije ( $k_a$ ), definisana kao odnos prirodnog



logaritma od 2,  $\ln 2$  i poluvremena apsorpcije jedinjenja ( $t_{a,1/2}$ ), penetracija kroz krvno-moždanu barijeru ( $\log BB$ ), vezivanje za proteine plazme ( $PPB$ ) (Winiwarter i sar., 1998; Linnankoski i sar., 2006; revijalni prikaz u Hou i sar., 2006; Perišić-Janjić i sar., 2011; Perišić-Janjić i sar., 2013; Milošević i sar., 2013; Milošević i sar., 2014a; 2014b; Wang i sar., 2015), rastvorljivost,  $\log S$  (Yamashita i Hashida, 2004).

U prediktivnim modelima vezanim za apsorpciju farmaceutika, dobijenim QSPKR analizom, korišćeni su razni molekularni deskriptori i metode analize, od kojih je najzastupljenija višestruka linearna regresija, MLR. Npr. Zhao i sar. (2002) izveli su značajnu regresionu analizu između procenta apsorpcije i Abraham deskriptora ili  $ClogP$ . Linnankoski i sar. (2006) korelirali su  $\log k_a$  sa  $\log D_{7,4}$ , polarnom površinom ( $PSA$ ) i donorskim vodoničnim vezama,  $HBD$  (eng. *Hydrogen Bonding Donors*). Milošević i sar. (2014b) zaključili su da je, pored molekulske mase i ukupne polarne površine,  $TPSA$  (engl. *Total Polar Surface Area*), lipofilnost molekula najznačajniji deskriptor u korelaciji sa  $k_a$ . Yamashita i Hashida (2004) navode dva modela za korelaciju rastvorljivosti jedinjenja u vodi. U prvom figurišu temperatura topljenja i podeoni koeficijent oktanol/voda. Drugi model znatno je složeniji i u njega su uključeni sledeći molekularni deskriptori: molarna refrakcija, dipolarnost/polarizabilnost, ukupne ili suma kiselih vodoničnih veza, ukupne ili suma baznih vodoničnih veza i McGowan karakteristična zapremina.  $P_{eff}$  je u najboljoj korelaciji sa parametrom lipofilnosti  $\log D_{5,5}$ ,  $PSA$  i  $HBD$  (Winiwarter i sar., 1998), a  $BBB$  izražen kao  $\log BB$  sa hromatografskim parametrom lipofilnosti i  $TPSA$  (Milošević i sar., 2014b).

### 2.5.2. Distribucija

Apsorbovano jedinjenje prenosi/distribuirano se u krvotok kroz telo. Distribucija je reverzibilan proces – dok neki molekuli mogu da interaguju sa receptorima na ćelijskoj membrani ili u ćeliji, drugi molekuli se mogu vratiti u krvotok. Prenos jedinjenja iz krvotoka do mesta delovanja prvenstveno zavisi od protoka krvi, kapilarne permeabilnosti, stepena vezivanja jedinjenja za krv i proteine ćelije i od relativne lipidne rastvorljivosti molekula.

Zapremina distribucije ( $V_d$ ) je jedan od najznačajnijih farmakokinetičkih parametara iako nema fizičko ili anatomsko značenje. Predstavlja merilo relativne raspodele leka između plazme i ćelija. Jedinice su L/kg ili mL/kg telesne mase. Visoke vrednosti  $V_d$  znače da je lek veoma lipofilan i da može biti akumuliran u ćelijskim lipidima što može usporiti njegovu ekskreciju (Ghafourian i sar., 2006; Stepensky, 2011). Nasuprot tome, farmaceutici koji imaju niske vrednosti  $V_d$  zahtevaju učestaliji interval doziranja. Zapremina distribucije smanjuje se

sa vremenom kao funkcija penetracije i vezivanja jedinjenja (Wada i sar., 1998). Ova veličina ima značajan uticaj na druge farmakokinetičke parametre kao što su klirens i polu-život (engl. *half-life*).

Zapremina distribucije jedinjenja izražena preko vezivanja sa proteinom plazme i ćelijskim komponentama može se predstaviti sledećim izrazom (Kerns i Di, 2008):

$$V_d = V_P + V_T \frac{f_{u,P}}{f_{u,T}} \quad (2.7)$$

gde su  $V_P$  i  $V_T$  zapremine plazme i ćelija, a  $f_{u,P}$  i  $f_{u,T}$  frakcije jedinjenja nevezane u plazmi i ćeliji, redom. Ova formula zasnovana je na pretpostavci da vrednost zapremine distribucije odražava relativne količine jedinjenja koje se akumuliraju u plazmi prema akumulaciji u ćelijama (Stepensky, 2011).

U krv i ćelije jednako se distribuiraju umereno lipofilna jedinjenja i jedinjenja koja se umereno vezuju za proteine plazme i ćelijske komponente. Stepensky (2011) je našao da nevezana zapremina distribucije opisuje odgovarajuću distribuciju jedinjenja u telu i vremenski tok aktivnih koncentracija jedinjenja.

Za predviđanje  $V_d$  QSPKR analizom raznih klasa farmaceutika dobijeni su značajni polinomialni modeli sa strukturnim deskriptorima (Ghafourian i sar., 2006), 2D deskriptorima (Kharkar, 2010), elektronskim i topološkim deskriptorima (Paul i sar., 2009), 3D molekulskim deskriptorima van der Waalsova zapremina i Sanderson elektronegativnost, broj alifatičnih i aromatičnih amino grupa, broj beta-laktam prstenova i topološki 2D deskriptori (Louis i Agrawal, 2012), ACDlabs, Volsurf+ deskriptori (del Amo i sar., 2013), hromatografski parametri lipofilnosti, TPSA i molekulska masa (Milošević i sar., 2014b), plazma protein koeficijent,  $K_{t,p}$  (Freitas i sar., 2015).

### 2.5.3. Vezivanje molekula za proteine plazme

Većina terapeutika reverzibilno se vezuje za proteine plazme u različitom stepenu. Najveći kapacitet za vezivanje jedinjenja ima protein plazme albumin. Vezivanje jedinjenja za proteine plazme utiče na distribuciju jedinjenja u ćelije, jer samo jedinjenje koje nije vezano na raspolaganju je da penetrira u ćeliju, da se veže za receptor i ispolji aktivnost.

Frakcija vezana za proteine plazme, *PPB* (eng. *Plasma Protein Binding*) izražava se procentom ukupno prisutnog jedinjenja u plazmi koje je vezano za proteine plazme odnosno procentom ukupno prisutnog jedinjenja u organizmu koje je privremeno neaktivno.

Predviđanje opsega u kojem se jedinjenje vezuje za proteine plazme je kritična faza u istraživanju i razvoju lekova s obzirom na to da *PPB* utiče na farmakokinetičke osobine jedinjenja kao što su zapremina distribucije, biološki polu-život, klirens i eliminacija, kao i na farmakološke osobine jedinjenja (Schmidt i sar., 2010).

Poznavanje nevezane frakcije jedinjenja, *FUP* ili  $f_u$  (eng. *Fraction Unbound in Plasma*) bitno je iz više razloga, npr. za korelaciju ukupne koncentracije u plazmi sa aktivnošću i potencijalnim krajnjim efektom. Jedinjenja koja se snažno i čvrsto vezuju za protein plazme ograničena su na krvotok i ne ulaze značajno u ćelije. Kod njih je manje slobodne frakcije za terapijsko delovanje. Samo nevezani lek je aktivan i sposoban da difunduje kroz membrane. Zato se nevezana frakcija uzima za korelacije koje predstavljaju proteinsko vezivanje leka. Manje lipofilna jedinjenja manje se vezuju za proteine plazme i imaju više slobodne frakcije u plazmi. U krv i ćelije jednako se distribuiraju umereno lipofilna jedinjenja i jedinjenja koja se umereno vezuju za proteine plazme i ćelijske komponente. Stepensky (2011) je utvrdio da nevezana zapremina distribucije opisuje odgovarajuću distribuciju jedinjenja u telu i vremenski tok aktivnih koncentracija jedinjenja. Milošević i sar. (2013) pokazali su da nevezana frakcija jedinjenja, pored lipofilnosti, u visokoj korelaciji je i sa molarnom masom (MW) i ukupnom polarnom površinom jedinjenja (TPSA).

*In silico* modeli za predviđanje *PPB* izvode se QSAR/QSPKR analizom zasnovanom na molekulskim i fizičko-hemijskim osobinama jedinjenja ili molekulskim dokingom kojim se utvrđuju mesta vezivanja i položaji, na osnovu čega se dobijaju informacije za strukturne modifikacije jedinjenja. Postoje brojna istraživanja u kojima su obuhvaćena jedinjenja različite hemijske strukture za razvoj QSPKR modela. Pokazalo se da je lipofilnost najznačajniji faktor afiniteta vezivanja za proteine plazme (Mayer i van der Waterbeemd, 1985; Ghafourian i Amin, 2013; Perišić-Janjić i sar., 2013; Milošević i sar., 2014a; 2014b) čak i kada su u pitanju različite vrste podataka (Colmenarejo i sar., 2001).

#### 2.5.4. Krvno-moždana barijera

Krvno-moždana barijera (*BBB*) je složen celularni sistem sastavljen od endotelijalnih ćelija moždanih kapilara i ima značajnu ulogu u regulaciji izmene supstanci između krvi i mozga. Visoka penetracija neophodna je za većinu terapeutika, koji su namenjeni za terapiju obolenja centralnog nervnog sistema. Jedinjenja mogu prolaziti kroz *BBB* pasivnom difuzijom ili preko različitih membranskih transportnih sistema koji prenose jedinjenje u mozak ili iz mozga (aktivni efluks). Mogućnost prolaska terapijskog agensa kroz krvno-

moždanu barijeru definiše se logaritmom podeonog koeficijenta  $\log BB$  ( $\log BBB$ ), koji se može izračunati kao  $\log BB = c_{mozak}/c_{krv}$ , gde su  $c_{mozak}$  i  $c_{krv}$  ravnotežne koncentracije analiziranog jedinjenja u mozgu i krvi, redom (Cecchelli i sar., 2007).

Većina *in silico* modela za predviđanje BBB permeabilnosti izvedena je pod pretpostavkom da se terapijski agens transportuje kroz BBB pasivnom difuzijom. U revijalnom prikazu Hou i sar. (2006) dato je više primera predikcionih modela BBB permeabilnosti u kojima figurišu parametri lipofilnosti, PSA, Abrahamovi deskriptori, slobodna energija solvatacije i dr. Muehlbacher i sar. (2011) su razvili QSAR model za predviđanje  $\log BB$  zasnovan na PSA,  $\log P$ ,  $pK_a$ , naelektrisanjima i broju pozitivno jonizabilnih grupa. Sichrovska i sar. (2014) korelisali su  $\log BB$  i  $\Delta \log P$  ( $\log P_{oktanol/pufer} - \log P_{cikloheksan/pufer}$ ). Milošević i sar. (2014b) dobili su najbolje korelacije između  $\log BB$  i parametra lipofilnosti i TPSA. Carpenter i sar. (2014) su koristili tri molekulska deskriptora: izračunati  $\log P_{oktanol/voda}$  ( $ClogP$ ), PSA i polarizabilnost.

### 2.5.5. Permeabilnost

Efektivna permeabilnost u humanom jejunumu ( $Pe_{eff}$ ) jeste ključni kinetički parametar koji se koristi za opisivanje permeabilnosti kroz humanu intestinalnu membranu i značajno doprinosi performansama oralne apsorpcije jedinjenja. Zbog povezanosti  $Pe_{eff}$  i frakcija primenjene oralne doze koja se apsorbuje u gastro-intestinalnom traktu (apsorbovana frakcija,  $f_{ap}$  ili slobodna frakcija,  $f_a$ ),  $Pe_{eff}$  se naširoko koristi za *a priori* procene apsorpcije leka u različitim fazama procesa razvoja lekova.  $Pe_{eff}$  je jedan od dva indikatora za klasifikaciju farmaceutika u Biopharmaceuticals Classification System, BCS (Sun i sar., 2013). Visoka efektivna permeabilnost je kada je  $Pe_{eff} > 1 \times 10^{-4}$  cm/s, niska kada je  $Pe_{eff} < 0,2 \times 10^{-4}$  cm/s, a srednja je između ovih vrednosti (Bergström i sar., 2016).

Na permeabilnost jedinjenja pozitivno utiče njegova lipofilnost, a negativan uticaj imaju kapacitet vodoničnih veza i veličina molekula. Nasuprot tome, veoma polarna jedinjenja i veliki molekuli imaju ograničenu apsorpciju putem permeabilnosti (Matsson i sar., 2016).

Do sada su učinjeni mnogi pokušaji da se predvidi humana  $Pe_{eff}$ , različitim metodama, između ostalih i QSPR analizom (Winiwarter i sar. 1998; Sun i sar., 2014; Olivares-Morales i sar., 2015; Bergström i sar., 2016). Na primer, ispitivanja Winiwarter i sar. (1998) pokazala su da su najznačajniji parametri koji opisuju  $\log Pe_{eff}$  polarna površina (PSA), donorske vodonične veze (HBD) i lipofilnost (kompjuterski izračunat podeoni koeficijent neutralnog

oblika farmaceutika,  $ClogP$  ili eksperimentalno određen  $\log D_{5,5}$ ). Sun i sar. (2013) izložili su interno i eksterno vrednovan robustan QSPR model za predviđanje  $Pe_{eff}$  u kojem figurišu značajni strukturni parametri: parametar oblika index KAlpha 3, potencijal jonizacije, Balabanov topološki indeks, logaritam molekulske mase, donorske vodonične veze.

### 3. EKSPERIMENTALNI DEO

#### 3.1. Struktura stiril laktona

Predmet ove doktorske disertacije je ispitivanje 24 stiril laktona koji su sintetizovani u laboratoriji za bioorgansku i medicinsku hemiju, Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu.

Radi jednostavnije analize ispitivni stiril laktoni su podeljeni u četiri grupe:

- **I grupa:** prirodni stiril laktoni (+)-goniofufuron (**I.1**), 7-*epi*-(+)-goniofufuron (**I.2**) i benzil derivat 7-*epi*-(+)-goniofufurona **I.3**;
- **II grupa:** konformaciono kruti analozi (triciklični analozi) jedinjenja **I.1** i **I.2** (**II.1 - II.7**);
- **III grupa:** krasalakton **B** (**III.1**) i njegovi derivati (**III.2 - III.7**);
- **IV grupa:** krasalakton **C** (**IV.1**) i njegovi derivati (**IV.2 - IV.7**).

Nazivi, 2D i 3D strukture ispitivanih stiril laktona prikazane su u *Tabeli 3.1*.

#### 3.2. Hromatografska analiza stiril laktona

Hromatografska analiza stiril laktona izvedena je sa HPLC instrumentom Agilent Technologies 1100 Series (Agilent, Palo Alto, Kalifornija, SAD) sa diode-array (DAD) detektorom. Kao nepokretna faza korišćena je kolona ZORBAX SB-C18, (4,6×150 mm i.d., veličina čestica 5 µm; Agilent, Santa Clara, Kalifornija, SAD).

Ispitivani stiril laktoni su rastvoreni u acetonitrilu i u metanolu u koncentraciji od 1mg/mL i filtrirani kroz CHROMAFIL Xtra RC-45/25 HPLC filter (regenerisana celuloza, prečnik 25 mm, veličina pora 0,45 µm; Macherey-Nagel, Düren, Nemačka). Pokretne faze bile su binarne smeše acetonitril-voda (pH 3,28) i metanol-voda. Zapreminski udeo acetonitrila iznosio je 45–65 V/V (inkrement 5 V/V) a metanola 60–70 V/V (inkrement 2,5 V/V). Protok pokretne faze bio je 1,0 mL/min. Temperatura kolone od 25 °C održavana je

konstantnom tokom analiza. Detekcija jedinjenja **III.2**, **III.4**, **IV.3** i **IV.7** izvedena je na talasnoj dužini 210 nm, a ostalih na 254 nm. Sve analize ponavljane su tri puta.

Acetonitril i metanol su bili HPLC čistoće (AppliChem, Darmstadt, Nemačka). Ultračista voda je bila takođe HPLC čistoće.

Sa hromatograma su očitana retencionona vremena jedinjenja ( $t$ ) i mrtvo retenciono vreme ( $t_0$ ) kao prvi signal koji se pojavio na hromatogramu. Na osnovu *jednačine 2.4* izračunate su vrednosti kapacitetnih faktora jedinjenja ( $k$ ), logaritmi kapacitetnih faktora ( $\log k$ ) i iz *jednačine 2.5* konstante  $\log k_0$  i  $S$ . Ove konstante su korišćene za korelaciju sa *in silico* deskriptorima lipofilnosti molekula i farmakokinetičkim parametrima molekula. Pored toga, konstante  $\log k_0$  upotrebljene su u QSRR modelovanju i za korelacije sa *in silico* farmakološkim receptorima.

### 3.3. Izračunavanje molekulskih deskriptora

Za izračunavanje 81-og molekulskog deskriptora korišćeni su sledeći programi:

- ALOGPS 2.1 online program (VCCLAB, 2005);
- ChemBioDraw Ultra 12.0 (ChemBioOffice, 2012);
- ChemBio3D Ultra 12.0 (ChemBioOffice, 2012);
- I-Lab 2.0 (ACD/Labs online program);
- MarvinSketch 15.3.26 (ChemAxon);
- Molinspiration online program (Molinspiration Cheminformatics)
- PreADMET online program (PreADMET).

Odabir molekulskih deskriptora izveden je stepenastom selekcijom, *SS* (eng. *Stepwise Selection*). Na ovaj način odabrani molekulski deskriptori korišćeni su kao ulazni podaci za multiplu linearnu regresiju (MLR) koja je korišćena u QSRR modelovanju.

Optimizacija trodimenzionalne strukture molekula izvedena je metodom molekulsko mehaničkog polja sile (MM2) uz minimizaciju energije dok vrednost korena srednjeg kvadrata, RMS (eng. *Root Mean Square*) nije dostigla vrednost manju od 0,1 kcal/Å mol.

Tabela 3.1. 2D i 3D strukture i nazivi ispitivanih stilir laktona

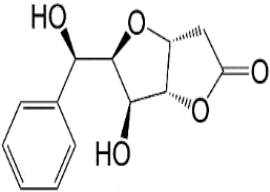
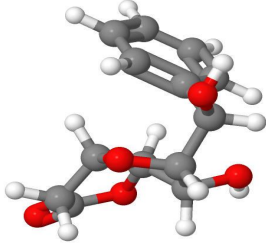
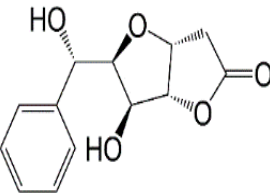
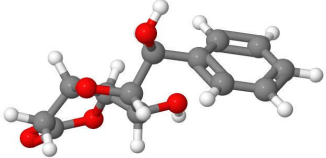
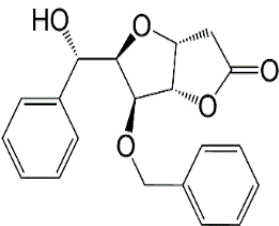
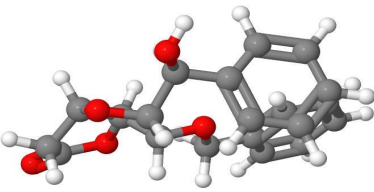
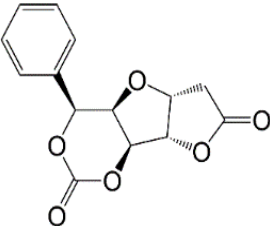
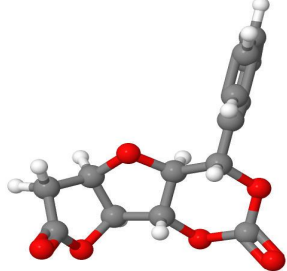
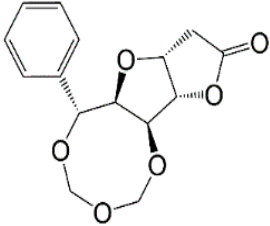
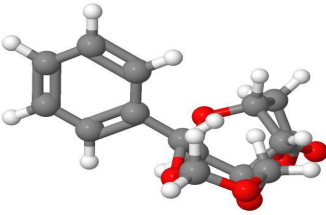
Jed.	Struktura stilir laktona i naziv	
	2D	3D
I.1	 <p>(+)-goniofufuron</p>	
I.2	 <p>7-<i>epi</i>-(+)-goniofufuron</p>	
I.3	 <p>3,6-Anhidro-5-<i>O</i>-benzil-2-deoksi-7-<i>C</i>-fenil-L-glicero-D-ido-heptono-1,4-lakton</p>	
II.1	 <p>3,6-Anhidro-2-deoksi-5,7-<i>O</i>-karbonil-7-<i>C</i>-fenil-L-glicero-D-ido-heptono-1,4-lakton</p>	
II.2	 <p>1,3,5-Trioksaepan</p>	



Tabela 3.1. 2D i 3D struktura i nazivi ispitivanih stilir laktona (nastavak)

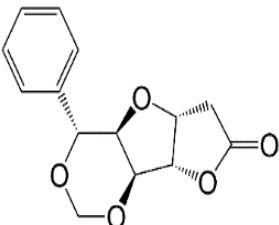
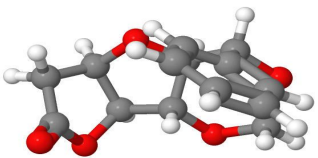
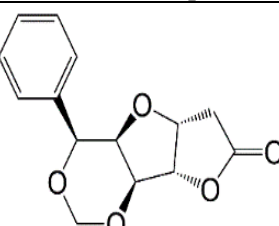
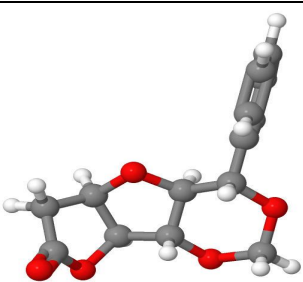
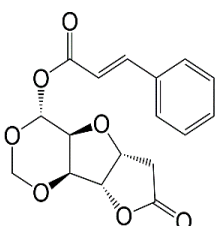
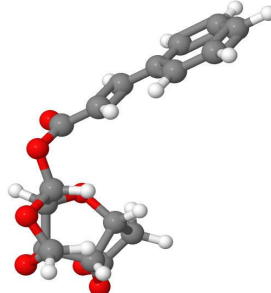
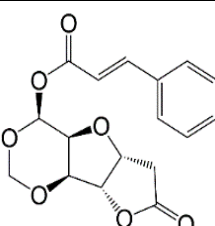
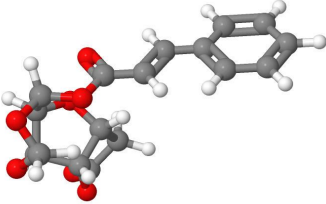
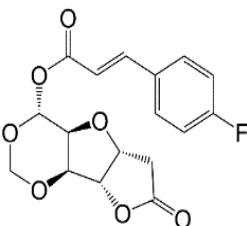
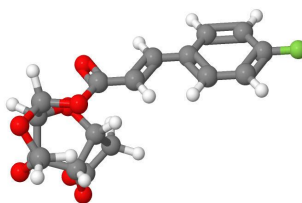
Jed.	Struktura jedinjenja i naziv	
	2D	3D
II.3	 <p>3,6-Anhidro-2-deoksi-5,7-<i>O</i>-metiliden-7-<i>C</i>-fenil-D-<i>glicero</i>-D-<i>ido</i>-heptono-1,4-lakton</p>	
II.4	 <p>3,6-Anhidro-2-deoksi-5,7-<i>O</i>-metiliden-7-<i>C</i>-fenil-L-<i>glicero</i>-D-<i>ido</i>-heptono-1,4-lakton</p>	
II.5	 <p>(7<i>R</i>)-3,6-Anhidro-2-deoksi-7-<i>C</i>-cinamoiloksi-5,7-<i>O</i>-metilen-D-<i>ido</i>-heptono-1,4-lakton</p>	
II.6	 <p>(7<i>S</i>)-3,6-Anhidro-2-deoksi-7-<i>C</i>-cinamoiloksi-5,7-<i>O</i>-metilen-D-<i>ido</i>-heptono-1,4-lakton</p>	
II.7	 <p>(7<i>R</i>)-3,6-Anhidro-2-deoksi-7-<i>C</i>-(<i>trans</i>-4-fluorocinamoiloksi)-5,7-<i>O</i>-metilen-D-<i>ido</i>-heptono-1,4-lakton</p>	

Tabela 3.1. 2D i 3D struktura i nazivi ispitivanih stiliranih laktona (nastavak)

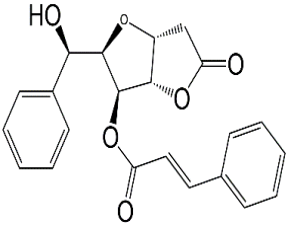
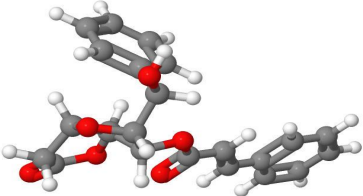
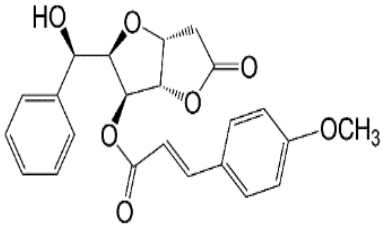
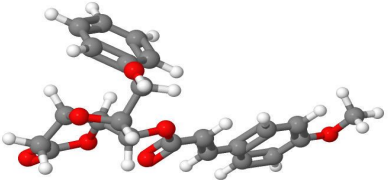
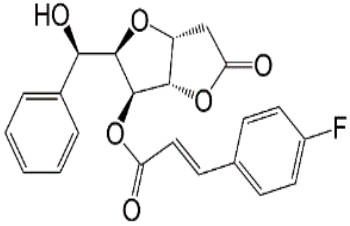
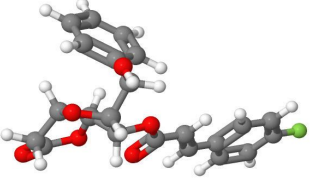
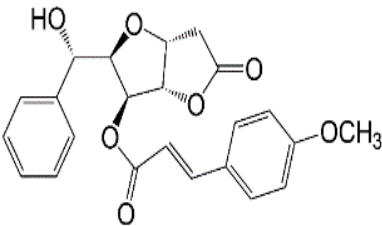
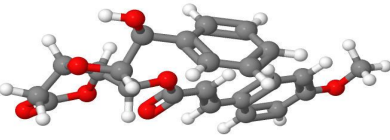
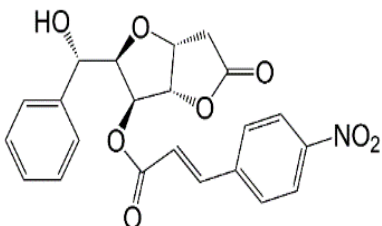
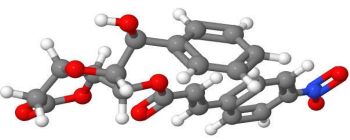
Jed.	Struktura jedinjenja i naziv	
	2D	3D
III.1	 <p>(+)-krasalakton B</p>	
III.2	 <p>3,6-Anhidro-5-O-(4-metoksicinamoil)-2-deoksi-7-C-fenil-D-glicero-D-ido-heptono-1,4-lakton</p>	
III.3	 <p>3,6-Anhidro-5-O-(4-fluorocinamoil)-2-deoksi-7-C-fenil-D-glicero-D-ido-heptono-1,4-lakton</p>	
III.4	 <p>3,6-Anhidro-5-O-(4-metoksicinamoil)-2-deoksi-7-C-fenil-L-glicero-D-ido-heptono-1,4-lakton</p>	
III.5	 <p>3,6-Anhidro-5-O-(4-nitrocinnamoyl)-2-deoksi-7-C-fenil-L-glicero-D-ido-heptono-1,4-lakton</p>	

Tabela 3.1. 2D i 3D struktura i nazivi ispitivanih stiliranih laktona (nastavak)

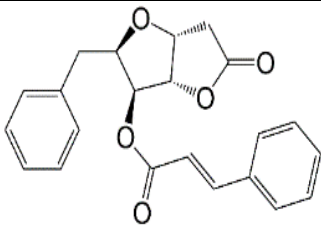
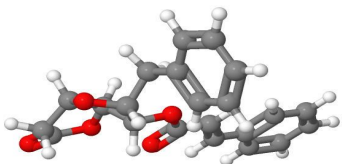
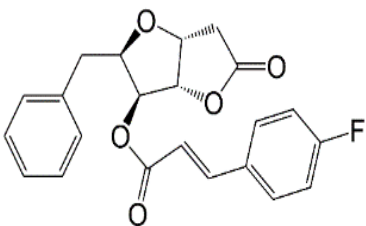
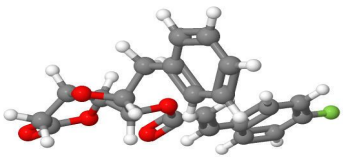
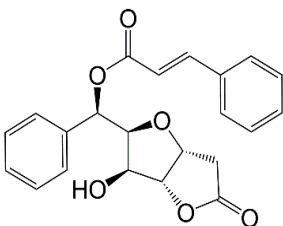
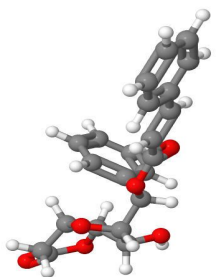
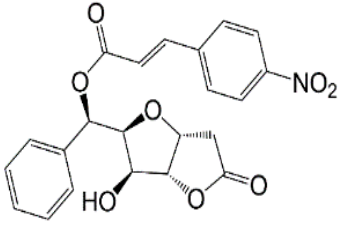
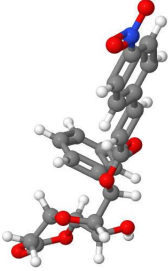
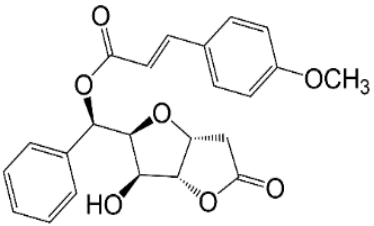
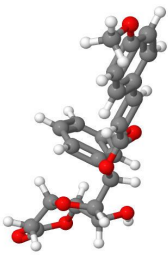
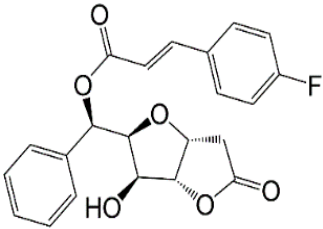
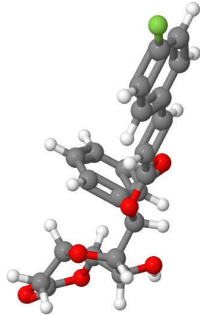
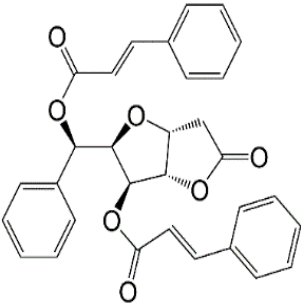
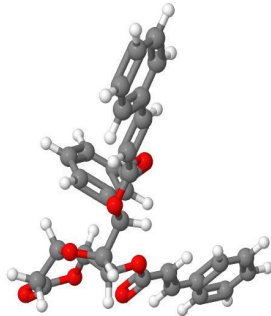
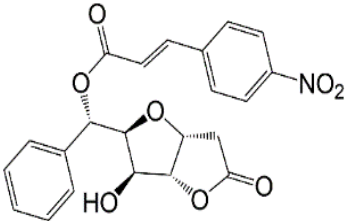
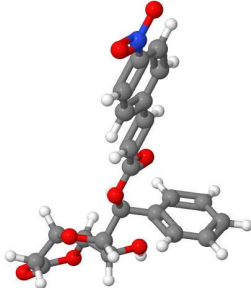
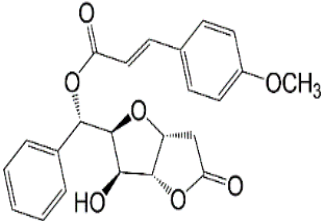
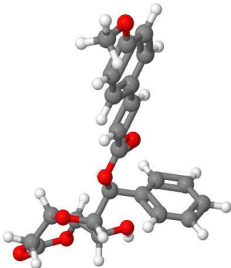
Jed.	Struktura jedinjenja i naziv	
	2D	3D
III.6	 <p>3,6-Anhidro-5-O-cinamoil-2,7-dideoksi-7-C-fenil-D-gluko-heptono-1,4-lakton</p>	
III.7	 <p>3,6-Anhidro-2,7-dideoksi-5-O-(4-fluorocinamoil)-2-deoksi-7-C-fenil-D-gluko-heptono-1,4-lakton</p>	
IV.1	 <p>(+)-krasalakton C</p>	
IV.2	 <p>3,6-Anhidro-7-O-(4-nitrocinaomil)-2-deoksi-7-C-fenil-D-glicero-D-ido-heptono-1,4-lakton</p>	
IV.3	 <p>3,6-Anhidro-7-O-(4-metoksicinaomil)-2-deoksi-7-C-fenil-D-glicero-D-ido-heptono-1,4-lakton</p>	

Tabela 3.1. 2D i 3D struktura i nazivi ispitivanih stiliranih laktona (nastavak)

Jed.	Struktura jedinjenja i naziv	
	2D	3D
IV.4	 <p>3,6-Anhidro-7-O-(4-fluorocinamoil)-2-deoksi-7-C-fenil-D-glicero-D-ido-heptono-1,4-lakton</p>	
IV.5	 <p>3,6-Anhidro-5,7-bis-(O-cinamoil)-2-deoksi-7-C-fenil-D-glicero-D-gluko-heptono-1,4-lakton</p>	
IV.6	 <p>3,6-Anhidro-7-O-(4-nitrocinamoil)-2-deoksi-7-C-fenil-L-glicero-D-ido-heptono-1,4-lakton</p>	
IV.7	 <p>3,6-Anhidro-7-O-(4-metoksicinamoil)-2-deoksi-7-C-fenil-L-glicero-D-ido-heptono-1,4-lakton</p>	

### 3.4. Hemometrijska regresija i klasifikacija

U obradi rezultata korišćene su tri regresione tehnike: linearna regresija (LR), multipla linearna regresija (MLR) i regresija parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS). Od klasifikacionih tehnika korišćena je hijerarhijska klaster analiza (HCA).

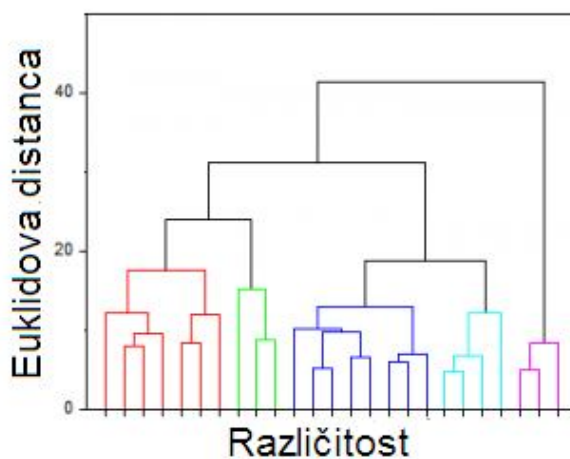
Hemometrijska obrada podataka izvedena je kompjuterskim programima OriginPro 8 (Microsoft) i NCSS 2007 (Hintze, 2007).

#### 3.4.1. Hijerarhijska klaster analiza

Klaster analiza je multivarijantna metoda koja ima za cilj da podatke podeli u grupe (klaster), tako da objekti unutar grupe budu jedan sa drugim slični (ili srodni) i različiti (ili nesrodni). Klasteruju se najsličniji (ili najhomogeniji) podaci unutar grupe i najveće razlike između grupa, najbolji ili izrazitiji. Deli se na *hijerarhijsku* i *nehijerarhijsku* klaster analizu. Kod hijerarhijske klaster analize novi klasteri formiraju se iz već postojećih, a kod nehirerarhijske svi klasteri formiraju se istovremeno.

Hijerarhijska klaster analiza može se izvoditi kao aglomerativna (spajajuća) i dviziona (deleća). U aglomerativnoj analizi polazi se od pojedinačnih podataka koji se povezuju u sve veće klaster, dok se u divizionoj analizi polazi od jednog klastera u kome su svi podaci, koji se zatim deli u odvojene klaster.

Proces hijerarhijske klaster analize predstavlja se dijagramom poznatim pod nazivom dendrogram (*Slika 3.1*). Ovaj dijagram ilustruje koji klasteri su spojeni u svakoj fazi analize i rastojanja između klastera u vreme spajanja. Pomoću Euklidove (*Euclidian*) distance predstavlja se rastojanje između dva objekta u  $n$ -dimenzionom prostoru promenljivih. Što je manja udaljenost, objekti su sličniji.



Slika 3.1. Dendrogram

### 3.4.2. Linearna regresija

Linearnom regresionom metodom (LR) korelira se svaki pojedini deskriptor sa aktivnošću jedinjenja. Pri tome se za generisanje seta QSAR jednačina koristi računanje standardnom linearnom regresijom, izraženom jednačinom 3.1:

$$y = A_o + A_1 x \quad (3.1)$$

gde je  $y$  zavisno promenljiva,  $x$  nezavisno promenljiva,  $A_o$  odsečak, a  $A_1$  nagib.

Značajnost rezultata izražava se koeficijentom determinacije  $R^2$  (ili  $r^2$ ).

### 3.4.3. Višestruka linearna regresija

Metoda višestruke (multiple) linearne regresije (MLR) u računanju i postavljanju QSAR jednačine primenom standardnog multivarijabilnog regresionog računanja koristi brojne deskriptore u jednostavnoj jednačini:

$$y = A_o + A_1 x_1 + A_2 x_2 + \dots A_n x_n \quad (3.2)$$

u kojoj su  $A_o$ , odsečak, dok  $A_1 \dots A_n$  predstavljaju regresione koeficijente za  $x_1 \dots x_n$ .

Prilikom primene MLR treba voditi računa o multikolinearnosti odnosno o visokoj kolinearnosti između korišćenih promenljivih. Kolinearnost se definiše faktorom inflacije varijanse, VIF (eng. *Variance Inflation Factor*):

$$VIF(x_i) = \frac{1}{1 - R_i^2} \quad x_i = 1, 2, 3, \dots k \quad (3.3)$$

U izrazu 3.3  $R_i^2$  je koeficijent determinacije između  $x_i$  i ostalih promenljivih.

U literaturi rezultati MLR smatraju se validnim ukoliko je  $VIF < 10$  (O'Brien, 2007; Young i sar., 2008).

### 3.4.4. Regresija parcijalnih najmanjih kvadrata

Regresija parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS) je bilinearni metod modelovanja zasnovan na višestrukoj regresiji i analizi glavnih komponentata. PLS metod redukuje veliki broj deskriptora kao nezavisno promenljivih iz matrice  $X$  na nekoliko glavnih komponentata ili latentnih promenljivih koje su većinom u korelaciji sa matricom  $Y$  odnosno aktivnošću  $Y$ .

Zato, rešenja dobijena regresijom parcijalnih najmanjih kvadrata imaju bolju predikcionu moć.

### 3.4.5. Validacija QSAR/QSRR modela

Značajnost (validacija) QSAR/QSRR modela, odnosno LR i MLR modela izvedena je standardnim, internim (*cross*-) i eksternim parametrima validacije (Chiro i Gramatica, 2011; Chiro i Gramatica, 2012; Gramatica i Sangion, 2016).

Standardni statistički parametri i njihove vrednosti na osnovu kojih se vrednuju rezultati su (Jevrić i sar., 2013):

- Pirsonov (Pearson's) koeficijent korelacije,  $R$  ;

$$R = \frac{n \cdot \sum_{i=1}^n x_i \cdot y_i - \left(\sum_{i=1}^n x_i\right) \cdot \left(\sum_{i=1}^n y_i\right)}{\sqrt{\left(\left(n \cdot \sum_{i=1}^n x_i^2\right) - \left(\sum_{i=1}^n x_i\right)^2\right) \cdot \left(\left(n \cdot \sum_{i=1}^n y_i^2\right) - \left(\sum_{i=1}^n y_i\right)^2\right)}} \quad (3.4)$$

- koeficijent determinacije (eng. *Squared correlation coefficient*),  $R^2 > 0,64$ ;

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - y_{i,pred})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (3.5)$$

- podešeni koeficijent determinacije (eng. *Adjusted  $R^2$* ),  $R^2_{adj} > 0,70$ ;

$$R^2_{adj} = 1 - (R^2) \cdot \left(\frac{n-1}{n-p-1}\right) \quad (3.6)$$

- $F$ -vrednost (Fišerov (Fisher) test);

$$F = \frac{\sum_{i=1}^n (y_{i,pred} - \bar{y})^2}{p} \cdot \frac{n-p-1}{\sum_{i=1}^n (y_i - y_{i,pred})^2} \quad (3.7)$$

- koren srednje kvadratne greške,  $RMSE$  (eng. *Root Mean Square Error*);

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - y_{i,pred})^2}{n-p-1}} \quad (3.8)$$

- $p$ -vrednost (verovatnoća).

U internoj validaciji, korišćena je *cross* (unakrsna) *validacija* i to njen najjednostavniji prilaz „izostavi jednog iz modela“, *LOO* (eng. *Leave-One-Out*) sa sledećim parametrima koji se vrednuju (Veerasamy i sar., 2011; Żydek i Brzezińska, 2012; Kovačević i sar., 2013):

- koeficijent determinacije unakrsne validacije (eng. *cross-validation*),  $R_{cv}^2 > 0,60$ ;

$$R_{cv}^2 = 1 - \frac{PRESS}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} = 1 - \frac{PRESS}{TSS} \quad (3.9)$$

- suma kvadrata odstupanja od predviđenih vrednosti, *PRESS* (eng. *Predicted Residual Error Sum of Squares*);

$$PRESS = \sum_{i=1}^n (y_i - y_{i,pred})^2 \quad (3.10)$$

- ukupna suma kvadrata, *TSS* (eng. *Total Sum of Squares*);

$$TSS = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 \quad (3.11)$$

- $PRESS/TSS < 0,4$ ;
- standardna devijacija određivanja,  $SD_{PRESS}$ ;

$$SD_{PRESS} = \sqrt{\frac{PRESS}{n}} \quad (3.12)$$

U jednačinama 3.4 - 3.12 su:

$y_i$  – eksperimentalna vrednost,

$\bar{y}$  – srednja vrednost eksperimentalnih vrednosti,

$y_{i,pred}$  – predviđena vrednost,

$n$  – broj komponenata, u Pirsonovom koeficijentu broj sparenih vrednosti  $x$  i  $y$ ,

$p$  – broj stepena slobode.

Za *eksternu validaciju*, u cilju utvrđivanja relevantnosti dobijenih modela (Golbraikh i Tropsha, 2002a; Golbraikh i Tropsha, 2002b) korišćeni su sledeći koeficijenti i njihove vrednosti:

- Pirsonov koeficijent korelacije eksternog test seta,  $R_{test} > 0,80$ ;
- Koeficijent determinacije eksternog test seta,  $R_{test}^2 > 0,64$ ;
- Koren srednje kvadratne greške eksternog test seta,  $RMSE_{test}$ .

Rregresiona izračunavanja izvedena su pomoću programa NCSS 2007 (Hintze, 2007).



### 3.5. Ispitivanje korelacije *in silico* farmakokinetičkih osobina i molekulskih deskriptora stiril laktona

U ovom delu rada korelirane su vrednosti:

- (a) hromatografskih retencionih konstanti  $\log k_o$  i  $S$  sa *in silico* farmakokinetičkim parametrima stiril laktona;
- (b) farmakokinetičkih parametara međusobno i
- (c) farmakokinetičkih parametara sa molekulskim deskriptorima lipofilnosti, geometrijskim, topološkim i ADME deskriptorima.

U korelacijama pod (a) korišćene su linearna regresija, LR (3.1) i kvadratna funkcija (parabola):

$$y = A_1x^2 + A_2x + A_0 \quad (3.13)$$

u kojoj su  $A_1$ ,  $A_2$  i  $A_0$  koeficijenti.

Utvrđivanje najbolje zavisnosti pod (b) i (c) između farmakokinetičkih parametara i molekulskih deskriptora izvedeno je linearnom (*jednačina 3.1*) i multiplom linearnom regresijom (*jednačina 3.2*).

Rregresiona izračunavanja urađena su programima OriginPro (Microsoft) i NCSS 2007 (Hintze, 2007).

### 3.6. Ispitivanje biološke aktivnosti stiril laktona

Ispitivani stiril laktoni testirani su *in vitro* prema sledećim humanim malignim ćelijskim linijama: kancer prostate (PC3), kancer debelog creva (HT-29), melanom (Hs294T), adenokarcinom pluća (A549). Takođe, ispitana je njihova antiproliferativna aktivnost i prema normalnim ćelijama fetalnih fibroplasta pluća (MRC-5). Kao pozitivna kontrola korišćen je komercijalni antitumorski agens doksorubicin (DOX).

Citotoksična aktivnost određena je standardnom kolorimetrijskom analizom (MTT test) nakon 72 sata izlaganja ćelija delovanju rastućih koncentracija ispitivanih jedinjenja (Popsavin i sar., 2006). Metoda je zasnovana na redukciji tetrazolijumove soli, MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid] u formazan (plavo obojeni proizvod) dejstvom mitohondrijalnog enzima sukcinat dehidrogenaze. Količina nagrađenog formazana direktno je srazmerna broju živih (vijabilnih) ćelija. Apsorbanca je očitana na test talasnoj dužini od 540 nm i referentnoj talasnoj dužini od 690 nm. Rezultati su izraženi kao  $IC_{50}$  (eng. *Inhibition*

*Concentration*), tj. kao koncentracija jedinjenja potrebna da inhibira rast 50% ćelija u poređenju sa netretiranom kontrolom.

Ove analize izvedene su u Institutu za onkologiju Vojvodine u Sremskoj Kamenici.

### 3.7. Molekulski doking stiril laktona

Analiza molekulskog dokinga urađena je sa stiril laktonima i komercijalnim citostatikom abirateronom, poznatim inhibitorom enzima citohrom P450 17A1 koji je aktivan prema PC3 ćelijama. Trodimenzionalna struktura svih liganada izvedena je Chemskech programom (O'Boyle i sar., 2011). Geometrijska optimizacija liganada generisana je metodom Powellog konjugovanog gradijentnog algoritma sa konvergencionim kriterijumom od 0,05 kcal/Åmol korišćenjem MMFF94 energije polja (eng. *Merck Molecular Force Field*) i MMFF94 naelektrisanjem atoma (Halgren, 1996). Maksimum iteracija bio je 1000. Trodimenzionalne koordinate molekula receptora, citohroma P450 17A1 (P450c17) preuzete su iz baze podataka Protein Data Bank (PDB ID: 3RUK:A). Ova posebna struktura receptora odabrana je za analize zbog prisustva poznatog inhibitora rasta ćelija PC3 abiraterona i zbog dobre rezolucije (2,6Å). Pre pripreme proteina, abirateron je izdvojen iz strukture kompleksa. Atomska naelektrisanja određena su MMFF94 metodom. Struktura proteina pripremljena je za molekulski doking simultanim dodatkom vodonikovih atoma, prilagođavanjem tipova protonacije i optimizacijom krajeva molekula. Doking simulacija izvedena je programom Surflex-Dock sa fleksibilnim H atomima (Jain, 2003). Rezultati su vizuelizovani pomoću programa PyMOL (*The PyMOL Molecular Graphics System*).

### 3.8. 3D-QSAR analiza stiril laktona

3D-QSAR analiza rađena je za ćelijsku liniju PC3, za koju je urađen i molekulski doking. 3D strukture svih jedinjenja, optimizovane su tako da konformacije imaju najmanju potencijalnu energiju, kako je opisano u 3.7.

Odlučujući korak u konstrukciji QSAR modela je odabir templata (šablon) molekula za poravnanje (Liu i sar., 2011). S obzirom na to da su ispitivani stiril laktoni slične strukture, furano-furanonski biciklični sistem je odabran kao zajednički strukturni segment (templat) za poravnanje. Najaktivnije jedinjenje, **II.7** za koje se pretpostavlja da ima najpovoljniju bioaktivnu konformaciju, korišćeno je kao referentni molekul za preklapanje (eng. *superimposition*) molekula iz serije ispitivanih stiril laktona.

3D-QSAR analiza izvedena je primenom CoMFA i CoMSIA metoda (Cramer i sar., 1988; Klebe i sar., 1994., Klebe i Abraham, 1999; Cramer, 2012). CoMFA model konstruisan je izračunavanjem vrednosti elektrostatičkog i sternog efekta (osobine) molekulskog polja komponenata trening seta, postavljenih u trodimenzionalnu rešetku na pravougaonoj mreži koja okružuje molekule u trening setu i korelira ih sa njihovom bioaktivnošću. Izračunavanja su urađena statističkim metodom PLS. Za CoMSIA model sterna, elektrostatički, vodonične veze i hidrofobni efekti polja liganada procenjeni su takođe na tačkama pravougaone mreže. Vrednosti polja su računata sumiranjem vrednosti datog atoma, ponderisana Gaussianovom funkcijom razmaka između tačke mreže i atoma.

CoMFA i CoMSIA deskriptor polja dobijen je upotrebom 3D kvadratne rešetke sa razmakom tačaka u mreži od 1 Å. U CoMFA modelu, hibridni  $sp^3$  ugljenikov atom sa pozitivnim naelektrisanjem upotrebljen je kao proba za izračunavanje sternih i elektrostatičkih polja u kojima su njihove vrednosti energije bile definisane (ograničene) na 30 kcal/mol. Veličina rešetke i veličina koraka probe podešeni su automatski.

PLS regresionom analizom odabran je najbolji model linernom korelacijom CoMFA i CoMSIA deskriptora polja, kao nezavisno promenljivih sa  $pIC_{50}$  vrednostima ( $-\log IC_{50}$ ) kao zavisno promenljivih (Bush i Nachbar, 1993).

*Cross*-validacija izvedena je LOO metodom (Tetko i sar., 2001). Optimalan broj komponenata korišćen u krajnjim analizama utvrđen je *cross*-validacionim metodom.

Za validaciju dobijenog 3D-QSAR modela korišćeni su neki od standardnih statističkih parametara ( $R$ ,  $R^2$ ,  $F$ -vrednost,  $p$ -vrednost), robusnost- $R^{2Scramble}$ , stabilnost i *cross*-validacioni parametri (standardna devijacija,  $SD$  i koeficijent  $Q^2$ ). Koeficijent  $R^2$  i *cross*-validacioni koeficijent  $Q^2$  izračunati su na osnovu sledećih izraza:

$$R^2 = 1 - \frac{\sum (Y_{eksp} - Y_{pred})^2}{\sum (Y_{eksp} - \bar{Y})^2} \quad (3.14)$$

$$Q^2 = 1 - \frac{\sum (Y_{eksp} - Y_{CVpred})^2}{\sum (Y_{eksp} - \bar{Y})^2} \quad (3.15)$$

Pri čemu su:

$Y_{eksp}$  – aktivnost molekula određena eksperimentalno,

$Y_{pred}$  – predviđena aktivnost molekula,

$\bar{Y}$  – srednja aktivnost celokupnog trening seta molekula,

$Y_{CVpred}$  – predviđena aktivnost molekula *cross*-validacijom.

## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

### 4.1. Analiza strukture ispitivanih stiril laktona

Ispitivani stiril laktoni podeljeni su na osnovu strukture u četiri grupe, kako je navedeno u Poglavlju 3.1 (*Tabela 3.1*). Svi molekuli imaju zajednički strukturni segment, furano-furanonski biciklični prsten, tetrahidro-furo[3,2-b]furan-2-on. Molekuli **I.1**, **I.2**, **III.1** i **IV.1** su prirodna jedinjenja, a ostalih dvadest su novosintetizovana jedinjenja (**I.3**, **II.1 - II.7**, **III.2-III.7**, **IV.2 - IV.7**). Totalna sinteza (+)-goniofufurona (**I.1**) i 7-*epi*-(+)-goniofufurona (**I.2**) detaljno je opisana u radu Benedeković i sar. (2014a). (+)-Krasalaktoni B (**III.1**) i C (**IV.1**), odgovarajući 5,7-dicinamat **IV.5**, brojni novi analozi **III.2**, **III.3**, **IV.2 - IV.4**, odgovarajući 7-epimeri **III.4**, **III.5**, **IV.6**, **IV.7**, 7-deoksi derivati **III.6**, **III.7** (Benedeković i sar., 2014b), kao i triciklični laktoni **II.1 - II.7** (Benedeković i sar., 2014a) dobijeni su višefaznim sintetičkim sekvencama polazeći iz D-glukoze. Pored prirodnih jedinjenja **III.1** i **IV.1**, novosintetizovana jedinjenja **II.5 - II.7**, **III.2 - III.7**, **IV.2 - IV.7** takođe sadrže estarski vezanu cimetnu kiselinu (*O*-cinamoil grupa). Osnovni motiv za sintezu ovih derivata bila je činjenica da neki cinamoati pokazuju značajne antitumorske aktivnosti (De i sar., 2011).

Molekuli **I.2**, **I.3**, **II.1**, **II.4**, **II.6**, **III.4**, **III.5**, **IV.6** i **IV.7** su 7*S* konfiguracije, a molekuli **I.1**, **II.2**, **II.3**, **II.5**, **II.7**, **III.1 - III.3**, **IV.1 - IV.5** su 7*R* konfiguracije. Stereoizomeri su sledeća jedinjenja: **I.1** i **I.2**, **II.3** i **II.4**, **II.5** i **II.6**, **III.2** i **III.4**, **IV.2** i **IV.6**, **IV.3** i **IV.7** (*Tabela 3.1*). Veoma slabe kiseline su jedinjenja **I.1 - I.3**, **III.1 - III.5**, **IV.1 - IV.4**, **IV.6** i **IV.7**, a ostala jedinjenja su neutralna (*Tabela 4.1*).

Kako se iz *Tabele 4.1* vidi krasalakton C (**IV.1**) i njegovi derivati **IV.2 - IV.7** su jače kiseline, a krasalakton B (**III.1**) i njegovi derivati **III.2 - III.5** su slabije kiseline od prirodnih jedinjenja **I.1** i **I.2**. Najslabija kiselina je novosintetizovani molekul **I.3**.

Tabela 4.1. Konstante kiselosti ispitivanih stiril laktone (I-Lab 2.0)

Jed.	pK <sub>a</sub>	Jed.	pK <sub>a</sub>	Jed.	pK <sub>a</sub>
I.1	12,80	II.6	-	III.7	-
I.2	12.80	II.7	-	IV.1	12.60
I.3	13.30	III.1	13,00	IV.2	12,60
II.1	-	III.2	13,00	IV.3	12,60
II.2	-	III.3	13,00	IV.4	12,60
II.3	-	III.4	13,00	IV.5	-
II.4	-	III.5	13,00	IV.6	12.60
II.5	-	III.6	-	IV.7	12,60

## 4.2. Hromatografsko ponašanje ispitivanih stiril laktone

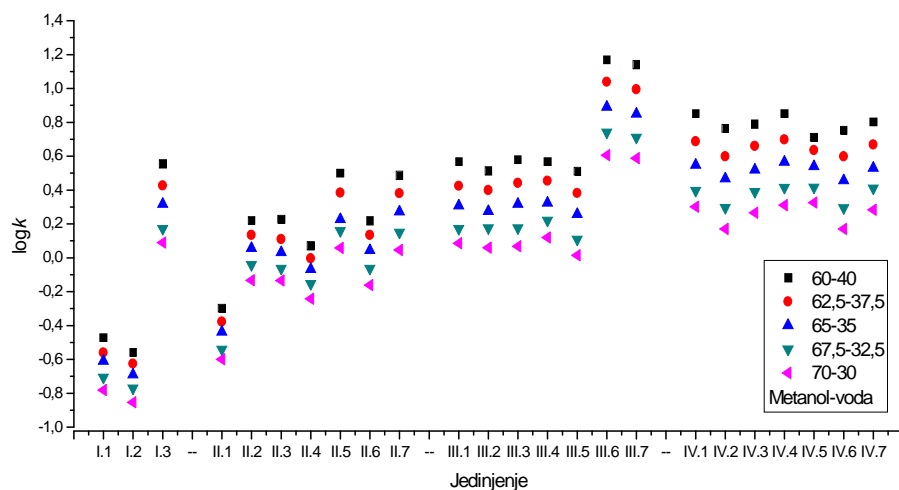
### 4.2.1. Hromatografska retencija

Hromatografska analiza stiril laktone izvedena je hromatografijom na obrnutim fazama na koloni oktadecil silika gela, C-18 sa pokretnim fazama metanol-voda i acetonitril-voda (pH 3,28), sa po pet različitih odnosa komponenata u sistemu rastvarača. Da bi se dobio pravilan oblik pika pokretna faza acetonitril-voda zakiseljavana je sirćetnom kiselinom. Rastvarači su odabrani tako da jedan bude protičan a drugi aprotičan. *Metanol* je protičan rastvarač odnosno rastvarač koji je u vodoničnoj vezi donor protona, dok je acetonitril aprotičan rastvarač koji je akceptor protona u vodoničnoj vezi.

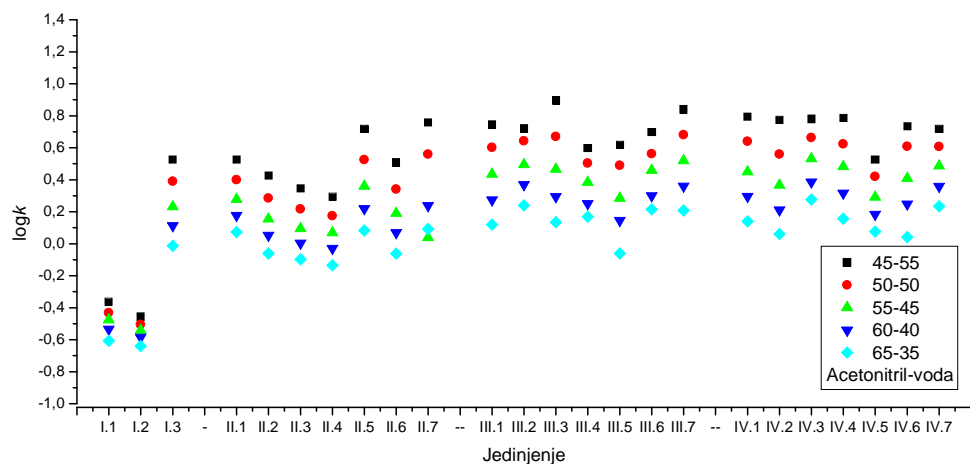
Retencioni podaci,  $\log k$ , retencione konstante  $\log k_0$  i  $S$  linearne zavisnosti retencije jedinjenja od zapreminskog udela metanola i acetonitrila u dvofaznoj pokretnoj fazi organski rastvarač-voda,  $\log k-\varphi$  (jednačina 2.5) kao i koeficijenti korelacije ove zavisnosti prikazani su u Prilogu, Tabele P-7.1 i P-7.2. Reprezentativni hromatogrami stiril laktone prikazani su u Prilogu na Slikama P-7.1 do P-7.7 za pokretnu fazu metanol-voda i P-7.8 do P-7.10 za pokretnu fazu acetonitril-voda.

U obe pokretne faze retencija jedinjenja pravilno opada sa povećanjem zapreminskog udela organskog rastvarača u sistemu rastvarača, pa je zavisnost retencije ( $\log k$ ) od zapreminskog udela organskog rastvarača ( $\varphi$ ) u pokretnoj fazi linearna u skladu sa jednačinom 2.5 (Slike 4.1, 4.2) sa visokom statističkom značajnošću odnosno  $R^2_{\text{adj}}$  je oko 1

(Prilog, Tabele P-7.1, P-7.2). Linearne regresione linije  $\log k - \varphi$  su paralelne za serije jedinjenja (Slike 4.3, 4.4), posebno u pokretnoj fazi metanol-voda (Slika 4.3).

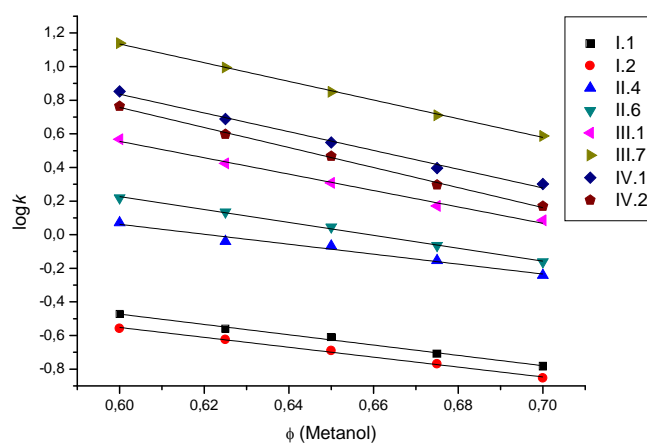


Slika 4.1. Retenciono ponašanje ispitivanih stiril laktona u pokretnoj fazi *metanol-voda*

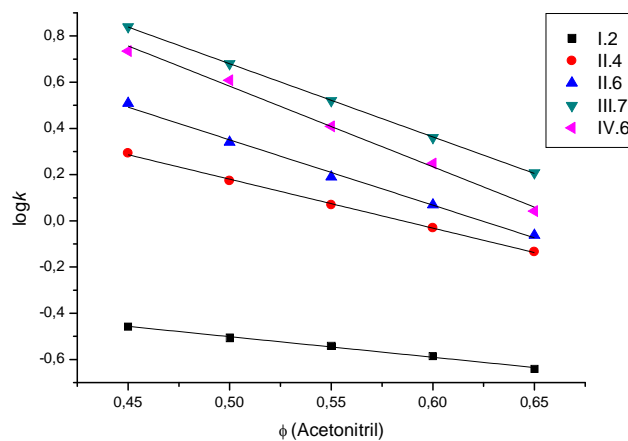


Slika 4.2. Retenciono ponašanje ispitivanih stiril laktona u pokretnoj fazi *acetonitril-voda*

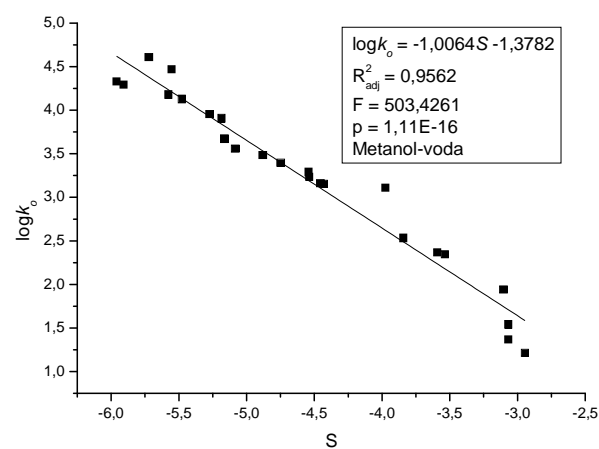
Takođe, sa visokom statističkom značajnošću dobijena je i linearna zavisnost između hromatografskih konstanti  $\log k_o$  i  $S$  (jednačina 2.5) u oba rastvarača što ukazuje da se ova jedinjenja mogu posmatrati kao kongeneri (Slike 4.5, 4.6).



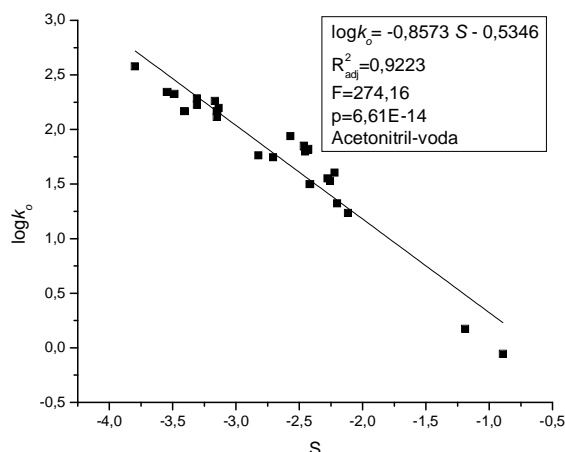
Slika 4.3. Zavisnost retencije jedinjenja,  $\log k$  od zapreminskog udela  $\phi$  ( $\Phi$ ) metanola u pokretnoj fazi



Slika 4.4. Zavisnost retencije jedinjenja,  $\log k$  od zapreminskog udela  $\phi$  ( $\Phi$ ) acetonitrila u pokretnoj fazi

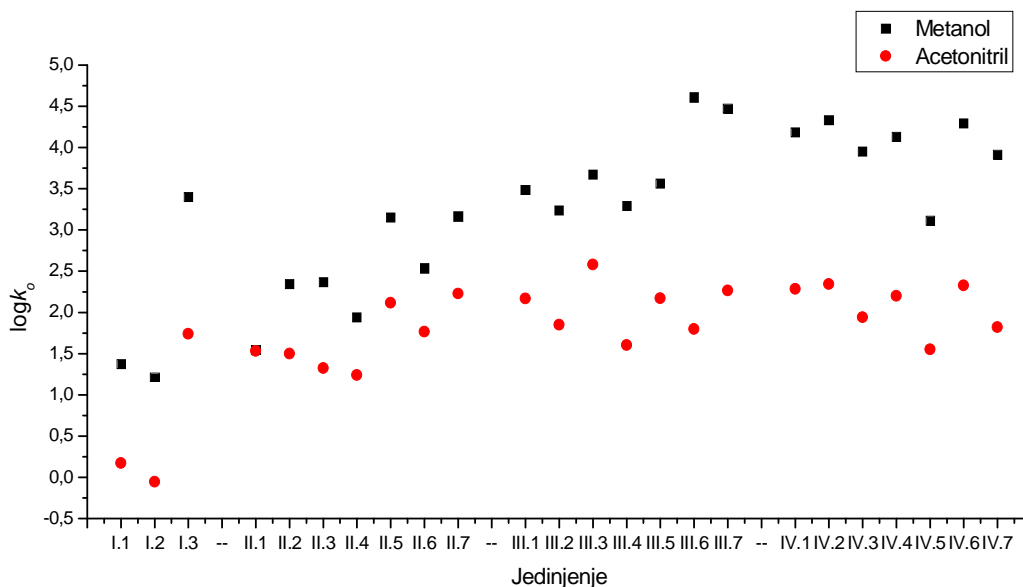


Slika 4.5. Zavisnost između hromatografskih konstanti  $\log k_o$  i  $S$  u pokretnoj fazi metanol-voda



Slika 4.6. Zavisnost između hromatografskih konstanti  $\log k_o$  i  $S$  u pokretnoj fazi *acetonitril-voda*

Kako su linije zavisnosti  $\log k - \phi$  paralelne (Slike 4.3, 4.4), odsečak  $\log k_o$  odnosno ekstrapolirana vrednost  $\log k$  sa 0% organskog rastvarača u pokretnoj fazi, tj. retencija jedinjenja u čistoj vodi, može se koristiti za interpretaciju retencije tog jedinjenja. Iz tog razloga je konstanta  $\log k_o$  korišćena u razmatranju retencionog ponašanja stiril laktona u pokretnim fazama sa metanolom i sa acetonitrilom (Slika 4.7).



Slika 4.7. Retenciono ponašanje ispitivanih stiril laktona u pokretnim fazama sa *metanolom* i sa *acetonitrilom*

Ponašanje stiril laktona u metanolu i acetonitrilu je slično izuzev što su jedinjenja pokretljivija odnosno imaju manju retenciju u pokretnoj fazi sa acetonitrilom (Slika 4.7). U

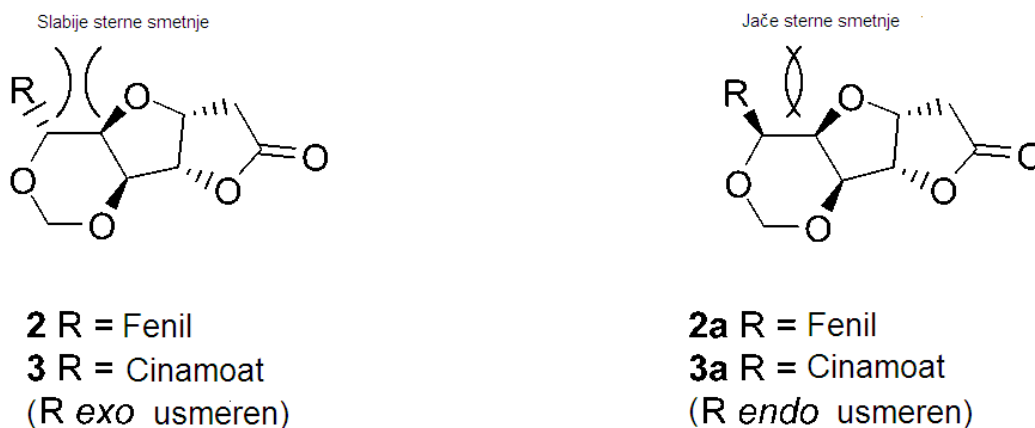


najvećem broju slučajeva jedinjenja 7*S*-konfiguracije (**I.2**, **II.1**, **II.4**, **II.6**, **III.4**, **IV.7**) imaju manju retenciju od jedinjenja 7*R*-konfiguracije (**I.1**, **II.2**, **II.3**, **II.5**, **II.7**, **III.3**, **IV.1**, **IV.2**). Prema očekivanju, najpolarnija jedinjenja **I.1** i **I.2**, koja sadrže dve hidroksilne grupe, imaju najmanju retenciju, tj. manji afinitet prema nepolarnoj nepokretnoj fazi. Naime, retencija u hromatografiji na obrnutim fazama je posledica nespecifičnih hidrofobnih interakcija jedinjenja sa nepokretnom fazom (Poole, Schuette, 1984). Hidrofobna priroda ispitivanih jedinjenja povećava se uvođenjem benzil grupe, cikličnog prstena i/ili estarske grupe cimetne kiseline usled čega ta jedinjenja imaju veću retenciju od polaznih jedinjenja **I.1** i **I.2**. Za razliku od pokretne faze sa acetonitrilom, u metanolu najveću retenciju imaju najmanje polarni 7-deoksi derivati **III.6** i **III.7**. Redosled razdvajanja jedinjenja u metanolu je sledeći: prirodni stiril laktoni **I.1** i **I.2**, triciklični laktoni (**II.1** - **II.7**), krasalakton B i derivati (**III.1** - **III.5**), krasalakton C i derivati (**IV.1** - **IV.4**, **IV.6**, **IV.7**). Benzil derivat (**I.3**) i 5,7-dicinamoil derivat (**IV.5**) imaju retenciju sličnu krasalaktonu B. Međutim, u acetonitrilu ovakve razlike u retenciji jedinjenja unutar grupe i po grupama nisu značajne odnosno neka jedinjenja imaju veoma sličnu retenciju, npr. **II.1** - **II.2**, **II.5** - **II.7**, **I.3** - **III.6**, **II.5** - **III.1**, **III.5** - **IV.4**, **II.7** - **III.6**). Uticaj elektron-donorskih grupa (F, NO<sub>2</sub>) i elektron-akceptorske grupe (OCH<sub>3</sub>) na retenciju u oba rastvarača je relativno mali (uporediti jedinjenja **II.5** - **II.7**, **III.1** - **III.3**, **III.6** - **III.7**, **IV.1** - **IV.4**, **IV.1** - **IV.2**, **III.1** - **III.2**, **IV.1** - **IV.3**), (Prilog, Tabele P-7.1, P-7.2, Slika 4.7).

Izomeri **I.1** i **I.2**, **III.2** i **III.4**, **IV.2** i **IV.6** kao i **IV.3** i **IV.7** imaju međusobno gotovo istu retenciju. Međutim, između izomera **II.3** i **II.4** postoji značajna razlika u retenciji kao i između izomera **II.5** i **II.6** (npr. u metanolu  $\Delta \log k_o$  (**II.3** - **II.4**) = 0,4304;  $\Delta \log k_o$  (**II.5** - **II.6**) = 0,6204. Pored toga, epimeri **II.3** i **II.5** koji su 7*R*-konfiguracije imaju veću retenciju od 7*S*-epimera **II.4** i **II.6**. Takođe, retencija izomera **II.5** i **II.6** sa cinamoil funkcijom u 7*C*-položaju veća je od retencije izomera **II.3** i **II.4** koji sadrže fenil funkciju u istom položaju, što ukazuje da cinamoil funkcija povećava hidrofobnost molekula.

Retenciono ponašanje izomera može se objasniti njihovim strukturnim osobinama. Tako, jedinjenja **I.1**, **I.2**, **III.2**, **III.4**, **IV.2**, **IV.6**, **IV.3** i **IV.7** imaju barem jednu slobodnu hidroksilnu grupu. Zbog toga, ona imaju veći afinitet prema polarnoj pokretnoj fazi i njihova retencija malo zavisi od stereochemije molekula. Nasuprot tome, veoma lipofilni molekuli **II.3**, **II.4**, **II.5** i **II.6** imaju veći afinitet prema nepolarnoj nepokretnoj fazi (C-18) čime njihova lipofilnost zavisi značajno od prostorne orijentacije aromatičnih prstenova. Aromatični ostaci molekula **II.3** i **II.5** su *exo*-orijentisani u odnosu na tetrahidrofurodioksin biciklični sistem prstena. Zato su oni prostorno dostupniji za vezivanje sa hidrofobnom nepokretnom fazom i

pokazuju veću retenciju. Sa druge strane, *endo*-orijentisane aromatične grupe u molekulima **II.4** i **II.6** su sterno više zaštićene (Slika 4.8) te je njihovo vezivanje za nepokretnu fazu slabije, a rezultat toga je manja retencija.



Slika 4.8. Stereohemijske osobine jedinjenja **II.3** i **II.5** (*exo*-izomeri) i **II.4** i **II.6** (*endo*-izomeri)

#### 4.2.2. Korelacija retencionih parametara $\log k_o$ i $S$ sa *in silico* lipofilnim parametrima molekula

Da bi se utvrdilo da li se hromatografske konstante  $\log k_o$  i  $S$  mogu poslužiti kao alternativni parametri lipofilnosti ispitivanih stiril laktona, korelisane su njihove vrednosti (Prilog, Tabele P-7.1, P-7.2) sa šesnaest *in silico* izračunatih deskriptora lipofilnosti (Prilog, Tabela P-7.3). U svim analizama nisu korišćeni *in silico* podaci za molekul **IV.5**, a u korelaciji sa  $\log S$  i podaci za molekul **II.7** s obzirom na to da su sve vrednosti deskriptora lipofilnosti značajno odstupale od vrednosti za ostale molekule. Analize su izvedene računarskim programima *NCSS 2007* i *OriginPro 8*. Rezultati ovih korelacija prikazani su u Tabelama 4.2 – 4.4 za pokretne faze metanol-voda i acetonitril-voda. U tabelama nisu dati podaci sa deskriptorom PC pošto nisu dobijene dobre zavisnosti. Najbolje korelacije prikazane su i grafički na Slikama 4.9 – 4.12.

Na osnovu rezultata iz Tabela 4.2 – 4.4 može se zaključiti da su linearne zavisnosti između *in silico* deskriptora lipofilnosti i hromatografskih konstanti  $\log k_o$  i  $S$ , koje su dobijene sa metanolom bolje nego sa acetonitriлом. Naime, konstanta  $\log k_o$  korelira veoma dobro ( $R^2_{\text{adj}} > 0,8$ ) sa većinom deskriptora lipofilnosti, a najbolje sa  $\text{ALOGpS}$  i Average  $\log S$  ( $R^2_{\text{adj}} 0,9$ ), Tabela 4.2. Takođe, i konstanta  $S$  veoma dobro ( $R^2_{\text{adj}} > 0,8$ ) korelira sa nekoliko deskriptora lipofilnosti ( $\text{miLogP}$ ,  $\text{ALOGpS}$ , Average  $\log S$ , Average  $\log P$ ), Tabela 4.3.

Veoma dobre korelacije  $\log k_o$  i  $S$  sa deskriptorima lipofilnosti ukazuju da se ove hromatografske konstante mogu koristiti kao hromatografski parametri lipofilnosti.

**Tabela 4.2.** Korelacije hromatografske konstante  $\log k_o$  i *in silico* deskriptora lipofilnosti za pokretnu fazu *metanol-voda*

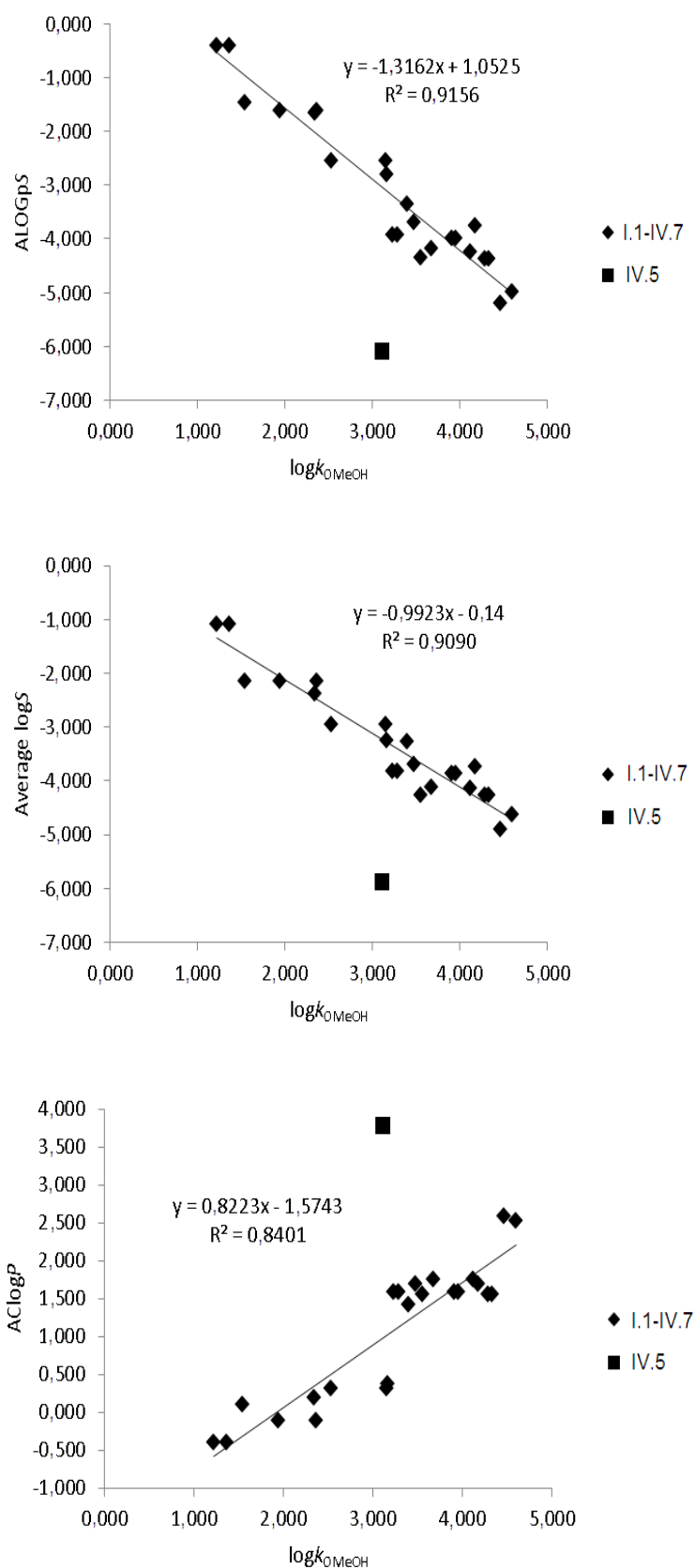
Linearna regresija	Statistički parametri		
	$R^2_{\text{adj}}$	F	p
$\text{ALOG}P_s = 0,9536(\pm 0,0906) \log k_o - 0,7836(\pm 0,3060)$	0,8328	110,61	$7,96 \cdot 10^{-10}$
$\text{AClog}P = 0,8223(\pm 0,0783) \log k_o - 1,5743(\pm 0,2642)$	0,8401	110,33	$8,13 \cdot 10^{-10}$
$\text{miLog}P = 1,0841(\pm 0,0849) \log k_o - 1,9783(\pm 0,2866)$	0,8804	162,92	$2,31 \cdot 10^{-11}$
$\text{ALOG}P = 0,9105(\pm 0,0936) \log k_o - 0,7581(\pm 0,3156)$	0,8100	94,76	$3,10 \cdot 10^{-9}$
$\text{MLOG}P = 0,7272(\pm 0,0774) \log k_o - 0,5697(\pm 0,2613)$	0,7985	88,17	$5,76 \cdot 10^{-9}$
$\text{XLOG}P_2 = 0,8520(\pm 0,0828) \log k_o - 0,6407(\pm 0,2792)$	0,8268	106,00	$1,16 \cdot 10^{-9}$
$\text{XLOG}P_3 = 0,8242(\pm 0,0861) \log k_o - 0,6691(\pm 0,2904)$	0,8048	91,72	$4,11 \cdot 10^{-9}$
$\text{Average log}P = 0,8768(\pm 0,0713) \log k_o - 0,9739(\pm 0,2405)$	0,8724	151,41	$4,58 \cdot 10^{-11}$
$\text{Clog}P = 1,0876(\pm 0,1228) \log k_o - 2,0096(\pm 0,4145)$	0,7787	78,42	$4,11 \cdot 10^{-9}$
$\text{ACDlog}P = 0,7589(\pm 0,11013) \log k_o - 0,4676(\pm 0,3418)$	0,7148	56,14	$2,31 \cdot 10^{-7}$
$\log D = 0,7714(\pm 0,0809) \log k_o - 0,5539(\pm 0,2731)$	0,7774	77,81	$1,66 \cdot 10^{-8}$
$\text{ALOG}pS = -1,3162(\pm 0,0884) \log k_o + 1,0525(\pm 0,2982)$	0,9156	222,91	$1,18 \cdot 10^{-12}$
$\text{AClog}S = -0,6677(\pm 0,0610) \log k_o - 1,3359(\pm 0,2057)$	0,8439	119,94	$3,83 \cdot 10^{-10}$
$\text{Average log}S = -0,9923(\pm 0,0685) \log k_o - 0,1400(\pm 0,2313)$	0,9090	209,68	$2,12 \cdot 10^{-12}$
$\log S^* = -0,9564(\pm 0,0772) \log k_o - 0,4954(\pm 0,2614)$	0,8788	153,29	$7,81 \cdot 10^{-11}$

U svim analizama nisu korišćeni podaci za jedinjenje IV.5; \*u analizi nisu korišćeni podaci i za jedinjenje II.7

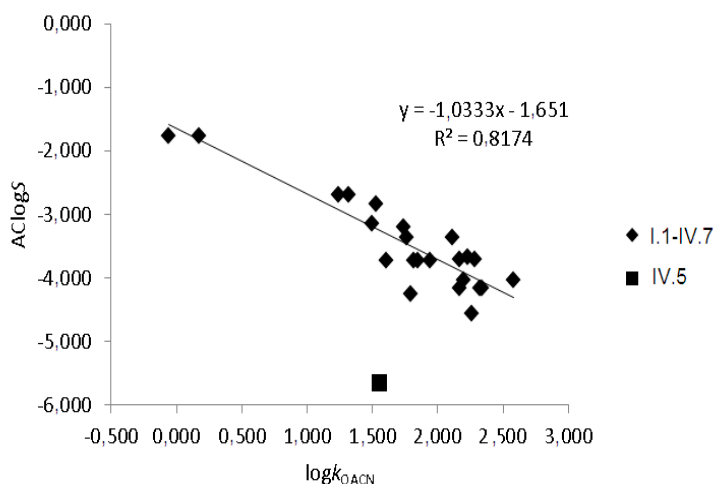
**Tabela 4.3.** Korelacije hromatografske konstante  $\log k_o$  i *in silico* deskriptora lipofilnosti za pokretnu fazu *acetonitril-voda*

Linearna regresija	Statistički parametri		
	$R^2_{\text{adj}}$	F	p
$\text{AClog}S = -1,0333(\pm 0,1066) \log k_o - 1,6510(\pm 0,2011)$	0,8174	94,00	$3,32 \cdot 10^{-9}$
$\text{Average log}S = -1,3986(\pm 0,1883) \log k_o - 0,8518(\pm 0,3554)$	0,7112	55,17	$2,65 \cdot 10^{-7}$
$\text{ALOG}pS = -1,7647(\pm 0,2763) \log k_o - 0,0526(\pm 0,5215)$	0,6439	40,78	$2,49 \cdot 10^{-7}$
$\log D = 1,0214(\pm 0,1631) \log k_o + 1,0340(\pm 0,3078)$	0,6346	39,21	$3,28 \cdot 10^{-6}$

U svim analizama nisu korišćeni podaci za jedinjenje IV.5



Slika 4.9. Korelacije između retencione konstante  $\log k_o$  i različitih  $\log P/\log S$  vrednosti za pokretnu fazu *metanol-voda* (MeOH)

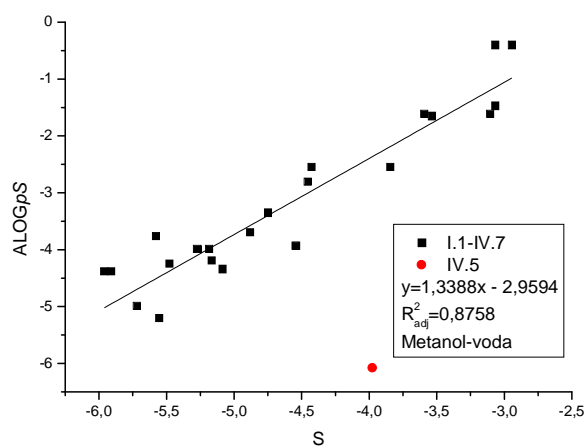
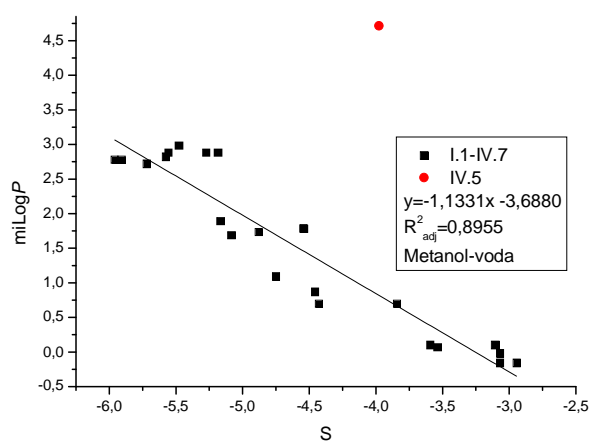


Slika 4.10. Korelacija između retencione konstante  $\log k_o$  i AClogS vrednosti za pokretnu fazu acetonitril-voda (ACN)

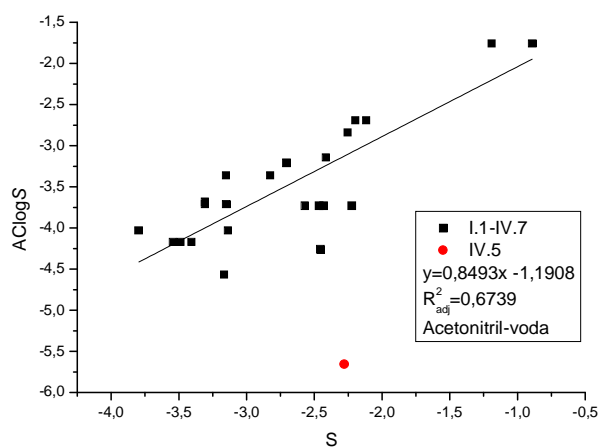
Tabela 4.4. Korelacije hromatografske konstante  $S$  i *in silico* deskriptora lipofilnosti za pokretne faze metanol-voda i acetonitril-voda

Linearna regresija	Statistički parametri		
	$R^2_{adj}$	F	p
<b>Metanol</b>			
$ALOGPs = -0,9000(\pm 0,1100) S - 1,8872(\pm 0,5165)$	0,7497	66,89	$5,76 \cdot 10^{-8}$
$AClogP = -0,8376(\pm 0,0882) S - 2,7714(\pm 0,4139)$	0,8022	90,25	$4,72 \cdot 10^{-9}$
$miLogP = -1,1331(\pm 0,0823) S - 3,6880(\pm 0,3863)$	0,8955	189,54	$5,55 \cdot 10^{-12}$
$ALOGP = -0,9926(\pm 0,1049) S - 2,0764(\pm 0,4922)$	0,7777	77,97	$1,63 \cdot 10^{-8}$
$MLOGP = -0,7439(\pm 0,0846) S - 1,6427(\pm 0,3970)$	0,7763	77,35	$1,74 \cdot 10^{-8}$
$XLOGP2 = -0,8678(\pm 0,0923) S - 1,8804(\pm 0,4364)$	0,7965	87,12	$6,39 \cdot 10^{-9}$
$XLOGP3 = -0,8301(\pm 0,0996) S - 1,8252(\pm 0,4672)$	0,7570	69,52	$4,21 \cdot 10^{-8}$
$Average \log P = -0,8923(\pm 0,0830) S - 2,2461(\pm 0,3895)$	0,8389	115,58	$5,38 \cdot 10^{-10}$
$ClogP = -1,1222(\pm 0,1295) S - 3,6588(\pm 0,6077)$	0,7711	75,12	$2,23 \cdot 10^{-8}$
$ACDlogP = -0,7243(\pm 0,1246) S - 1,3483(\pm 0,5846)$	0,5986	33,82	$9,00 \cdot 10^{-6}$
$\log D = -0,6899(\pm 0,1022) S - 0,3149(\pm 0,4799)$	0,6693	45,53	$1,12 \cdot 10^{-6}$
$ALOGpS = 1,3388(\pm 0,1071) S + 2,9594(\pm 0,5028)$	0,8758	156,18	$3,43 \cdot 10^{-11}$
$AClogS = 0,6702(\pm 0,0736) S - 0,4098(\pm 0,3456)$	0,7881	82,84	$9,81 \cdot 10^{-9}$
$Average \log S = 1,0046(\pm 0,0859) S + 1,2761(\pm 0,4030)$	0,8607	136,91	$1,16 \cdot 10^{-10}$
$\log S^* = 0,9679(\pm 0,0935) S + 0,8718(\pm 0,4397)$	0,8758	156,18	$3,43 \cdot 10^{-11}$
<b>Acetonitril</b>			
$AClogS = 0,8493(\pm 0,1246) S - 1,1908(\pm 0,3484)$	0,6739	46,46	$9,70 \cdot 10^{-7}$

U svim analizama nisu korišćeni podaci za jedinjenje IV.5; \*u analizi nisu korišćeni podaci i za jedinjenje II.7



Slika 4.11. Korelacija između retencione konstante  $S$  i različitih  $\log P/\log S$  vrednosti za pokretnu fazu *metanol-voda*



Slika 4.12. Korelacija između retencione konstante  $S$  i  $AClogS$  vrednosti za pokretnu fazu *acetonitril-voda*

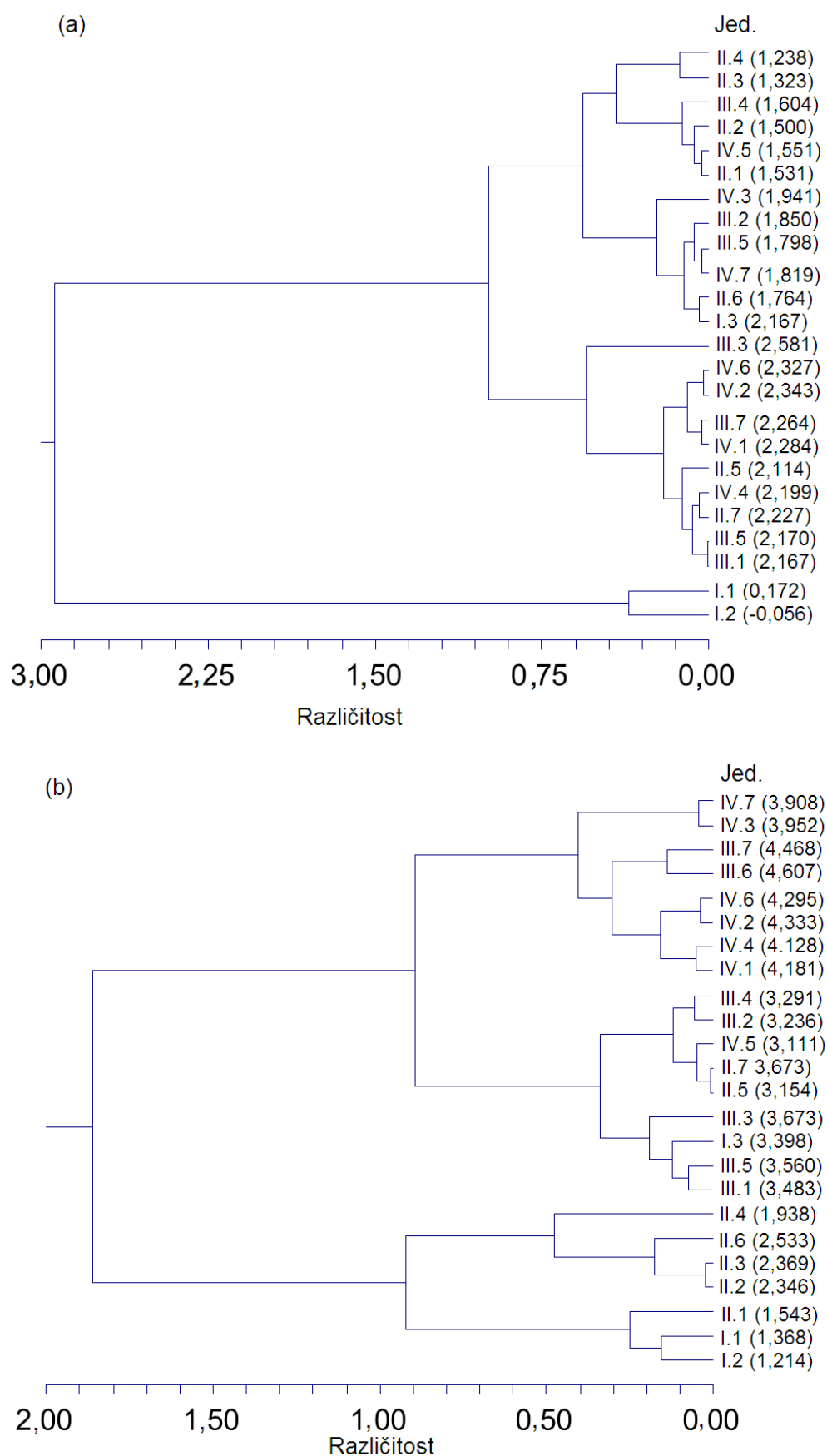
Sa acetonitrilom jedina značajnija korelacija dobijena je između  $\log k_o$  i AClogS ( $R^2_{\text{adj}} = 0,8174$ ), (Tabela 4.3, Slika 4.10). Ovo bi se moglo objasniti kombinovanim uticajem pH i sadržajem acetonitrila u poretnoj fazi (Vella i sar., 2014). Da bi se postigao odgovarajući oblik i širina pika, pokretna faza acetonitril-voda zakišeljavana je sirćetnom kiselinom (pH 3,28). Poznata je činjenica da pH pokretne faze, između ostalog, ima uticaj na relativnu količinu nejonizovanih i jonizovanih vrsta u pokretnoj fazi a time i na raspodelu nejonizovanih vrsta između dve faze. Povećanjem sadržaja acetonitrila u pokretnoj fazi od 45 do 65% manje su interakcije relativno polarnih jedinjenja sa nepokretnom fazom što rezultuje njihovom bržom elucijom verovatno zbog promene podeonog koeficijenta.

#### 4.2.3. Hijerarhijska klaster analiza

Da bi se utvrdilo da li u podacima za konstantu  $\log k_o$  ispitivanih stiril laktona, koja se pokazala kao pogodan hromatografski parametar lipofilnosti, postoji podela u značajne grupe urađena je hijerarhijska klaster analiza. Pored toga, urađena je i hijerarhijska klaster analiza zasnovana na *in silico* deskriptorima lipofilnosti molekula. Ove analize predstavljene su dendrogramima koji su prikazani na Slikama 4.13 i 4.14.

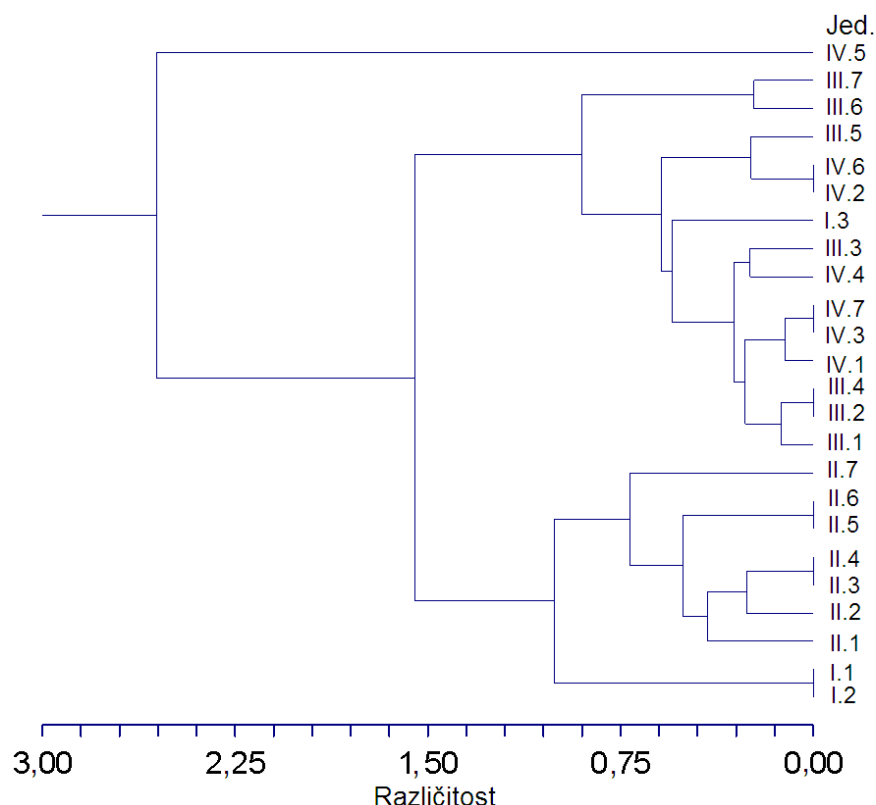
Dendrogram zasnovan na retencionoju konstanti  $\log k_o$  za acetonitril i metanol pokazuje dva dobro odvojena klastera u oba slučaja, ali jedinjenja nisu grupisana na isti način (Slika 4.13). Na dendrogramu za pokretnu fazu acetonitril-voda (Slika 4.13a) prvi klaster sadrži dva subklastera sa jedinjenjima čije su  $\log k_o$  vrednosti 1,238 – 2,581. U drugom klasteru su polazna jedinjenja **I.1** i **I.2** koja imaju izuzetno male  $\log k_o$  vrednosti (bliske nuli i negativne). Na dendrogramu za pokretnu fazu metanol-voda (Slika 4.13b) prvi klaster sadrži jedinjenja sa visokim a drugi sa niskim  $\log k_o$  vrednostima.

Dendrogram zasnovan na *in silico* deskriptorima lipofilnosti (Slika 4.14) veoma je sličan dendrogramu za pokretnu fazu metanol-voda (Slika 4.13b). U prvom klasteru su jedinjenja sa visokim retencionim podacima, visokim  $\log P$  i  $\log D$  i nižim vrednostima  $\log S$ . Drugi klaster čine jedinjenja koja imaju malu retenciju, niske  $\log P$  i  $\log D$  i veće  $\log S$  vrednosti. Molekul **IV.5** je van klastera zbog njegovih osobina, koje su ranije istaknute odnosno, vrednosti parametara lipofilnosti za ovaj molekul su značajno odstupale od vrednosti za ostale molekule.



Slika 4.13. Dendrogrami ispitivanih stiril laktone zasnovani na retencionoj konstanti  $\log k_o$  za pokretne faze (a) *acetonitril-voda* i (b) *metanol-voda*





Slika 4.14. Dendrogram ispitivanih stiril laktona zasnovan na deskriptorima lipofilnosti

#### 4.2.4. QSRR modelovanje za predviđanje hromatografske lipofilnosti

Za dobijanje QSRR modela pogodnih za predviđanje hromatografske lipofilnosti stiril laktona korišćene su linerna regresija (LR) i multipla linearna regresija (MLR). LR regresionom analizom korelirane su eksperimentalno dobijene  $\log k_o$  i *in silico* molekulski deskriptori i analizirana je veza između njih. U MLR analizi korelirane su  $\log k_o$  vrednosti sa više od jedne nezavisno promenljive odnosno sa više od jednog molekuskog deskriptora. Značajnost dobijenih LR i MLR modela proveravana je internom i eksternom validacijom (Chiro, Gramatica, 2011; Chiro, Gramatica, 2012; Gramatica, Sangion, 2016). Sva regresiona izračunavanja izvedena su NCSS 2007 programom (Hintze, 2007).

Ispitivani stiril laktoni podeljeni su u dva seta – kalibracioni i test set. Kalibracioni set sadržavao je 19 jedinjenja što je predstavljalo približno 80% ukupnog broja jedinjenja (**I.1, I.3, II.1 - II.5, II.7, III.1 - III.6, IV.1 - IV.3, IV.6, IV.7**). U test setu bila su četiri jedinjenja, po jedan predstavnik iz svake grupe (**I.2, II.6, III.7, IV.4**), odnosno oko 20% od ukupnog broja jedinjenja. Jedinjenje **IV.5** nije bilo uključeno u QSRR modelovanje zbog njegovih ranije istaknutih osobina. Generisani modeli dobijeni su korišćenjem kalibracionog seta a zatim je urađena interna i eksterna statistička provera (validacija).

Od izračunatih vrednosti 81-og molekuskog deskriptora, vrednosti odabranih molekulskih deskriptora (lipofilnost, ADME i bioaktivnost) za QSRR modelovanje prikazani su u tabelama u Prilogu (*Tabele P-7.3 do P-7.5*).

Linearni regresioni modeli LR i njihovi statistički parametri prikazani su u *Tabeli 4.5*.

*Tabela 4.5.* Linearni regresioni modeli i statistički parametri značajnosti

<b>LR1:</b> $\log k_0 \text{ ACN}^1 = -0,7381(\pm 0,0993) \text{ AClog}S - 0,7560 (\pm 0,3533)$					
<b>LR2:</b> $\log k_0 \text{ MeOH}^2 = -0,6881(\pm 0,0596) \text{ ALOGp}S + 1,0435 (\pm 0,2056)$					
<b>LR3:</b> $\log k_0 \text{ MeOH} = -0,9240(\pm 0,0823) \text{ Average log}S + 0,1528(\pm 0,2864)$					
<b>LR4:</b> $\log k_0 \text{ MeOH} = 0,7809(\pm 0,0724) \text{ miLog}P + 2,0820(\pm 0,1345)$					
<b>LR5:</b> $\log k_0 \text{ MeOH} = 0,9958(\pm 0,1058) \text{ Average log}P + 1,4089 (\pm 0,2153)$					
Parametri	LR1	LR2	LR3	LR4	LR5
	$\log k_0 \text{ ACN}$	$\log k_0 \text{ MeOH}$	$\log k_0 \text{ MeOH}$	$\log k_0 \text{ MeOH}$	$\log k_0 \text{ MeOH}$
<b>R</b>	0,8744	0,9417	0,9388	0,9341	0,9160
<b>R<sup>2</sup></b>	0,7646	0,8868	0,8813	0,8726	0,8390
<b>R<sup>2</sup><sub>adj</sub></b>	0,7508	0,8802	0,8743	0,8651	0,8295
<b>F</b>	55,22	133,21	126,18	116,44	88,60
<b>RMSE</b>	0,2729	0,3268	0,3347	0,3467	0,3897
<b>p</b>	0,000001	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
<b>R<sup>2</sup><sub>cv</sub></b>	0,6614	0,8622	0,8516	0,8354	0,8038
<b>TSS</b>	5,3767	16,03897	16,03897	16,03897	16,03897
<b>PRESS</b>	1,8208	2,2096	2,3803	2,6397	3,1466
<b>PRESS/TSS</b>	0,3386	0,1378	0,1484	0,1646	0,1962
<b>SD<sub>PRESS</sub></b>	0,3096	0,3410	0,3539	0,3727	0,4070
<b>R<sub>test</sub></b>	0,9726	0,9932	0,9884	0,9830	0,9917
<b>R<sup>2</sup><sub>test</sub></b>	0,9460	0,9865	0,9769	0,9662	0,9835
<b>RMSE<sub>test</sub></b>	0,3097	0,2143	0,2806	0,3391	0,2370

<sup>1</sup>ACN – acetonitril; <sup>2</sup>MeOH – methanol. Nazivi statističkih parametara dati su u poglavlju 3.4.5.

Iz *Tabele 4.5* može se zaključiti da je lipofilnost molekula (AClogS, ALOGpS, Average logS, miLogP, Average logP) dominantan faktor u svih pet predstavljenih modela. Za pokretnu fazu sa acetonitriлом to je AClogS, dok su za pokretnu fazu sa metanolom to ALOGpS, Average logS, miLogP, Average logP sa mnogo većom značajnošću. Kako lipofilnost molekula ima glavnu ulogu u transportu molekula kroz biološke membrane, dominantan uticaj lipofilnosti se pokazao i u QSRR modelovanju. Pored toga, retenciono

ponašanje ispitivanih stiril laktone u RP-HPLC sistemu zavisi od njihove lipofilnosti koja je najodgovornija za raspodelu molekula između nepokretne i pokretne faze. Visoke vrednosti podešenog (*adjusted*) koeficijenta determinacije ( $R^2_{adj} > 0,7$ ) i koeficijenta determinacije unakrsne validacije, tj. *cross*-validacionog koeficijenta ( $R^2_{cv} > 0,6$ ) ukazuju na veoma dobru statističku značajnost LR modela, posebno sa metanolom. Uz to, niske vrednosti za koren srednje kvadratne greške, RMSE (eng. *Root Mean Square Error*) za kalibracioni i test set kao i niske vrednosti za odnos suma kvadrata odsupanja od predviđenih vrednosti, PRESS (eng. *Predicted Residual Error Sum of Squares*)/ukupna suma kvadrata, TSS (eng. *Total Sum of Squares*), PRESS/TSS odnos ( $< 0,4$ ) doprinose statističkoj značajnosti dobijenih modela. Parametri standardne i *cross*-validacije su u skladu sa dobro poznatim vrednostima (Jevrić i sar., 2017). Na značajnost modela ukazuju i vrednosti parametara eksterne validacije  $R^2_{test}$  i  $RMSE_{test}$  za sve modele. Prema tome, svi LR modeli su statistički značajni sa stanovišta standardnih, *cross*- i eksternih statističkih parametara što potvrđuje prediktivnu mogućnost prikazanih modela.

Iz ukupnog seta molekulskih deskriptora, deskriptori za MLR modelovanje izabrani su stepenastom selekcijom, *SS*. U skladu sa Topliss-Castello pravilom (Topliss, Castello, 1972) maksimalan broj deskriptora u modelu je tri kako bi se izbegao prevelik broj parametara (pre-parametarizacija), (Minovski i sar., 2011). Modeli su tako odabrani da nema multikolinearnosti između molekulskih deskriptora, tj. faktor inflacije varijanse, *VIF* (eng. *Variance Inflation Factor*) je manji od 10 (O'Brien, 2007; Young i sar, 2008). Značajnost dobijenih modela izvedena je internom validacijom metodom unakrsne validacije „*izostavi jednog iz modela*”, LOO (eng. *Leave-One-Out*). MLR modeli i statistički parametri za te modele dati su u Tabeli 4.6.

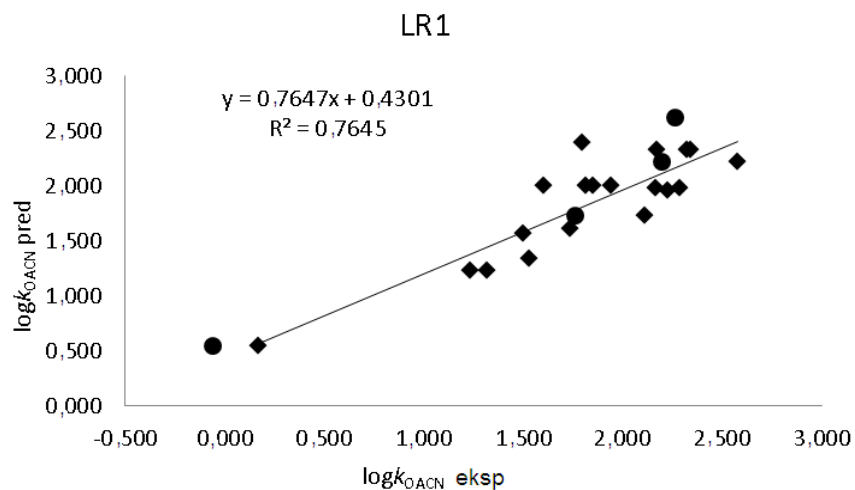
Mogućnost predviđanja  $\log k_o$  utvrđenim MLR modelima potvrđena je standardnim i *cross*-validacionim statističkim parametrima kao i eksternim test setom koji daje najpouzdanije informacije o prediktivnim osobinama tih modela. Visoke vrednosti  $R^2_{adj}$  i  $R^2_{cv}$  govore o dobroj statističkoj značajnosti utvrđenih modela. Takođe, male vrednosti RMSE za oba seta kao i male vrednosti PRESS/TSS i VIF ukazuju da su dobijeni modeli statistički značajni. U svim MLR modelima izuzev MLR3, figirišu dva lipofilna parametra – AClogS i ClogP u MLR1 i MLR2 (acetonitril) i miLogP i ALOGpS u MLR4, miLogP i MLOGP u MLR5, miLogP i ALOGP u MLR6 (metanol). Ovo ističe lipofilnost kao glavnu osobinu molekula koja utiče na hromatografsku retenciju. Pored parametara lipofilnosti modeli uključuju i tri ADMET deskriptora PPB (vezivanje za proteine plazme) u MLR1, GPCR (G protein spregnuti receptori) u MLR2 i MLR3 i PI (inhibitor proteaze) u MLR4 - MLR6.

Tabela 4.6. Višestruki linearni regresioni modeli i statistički parametri značajnosti

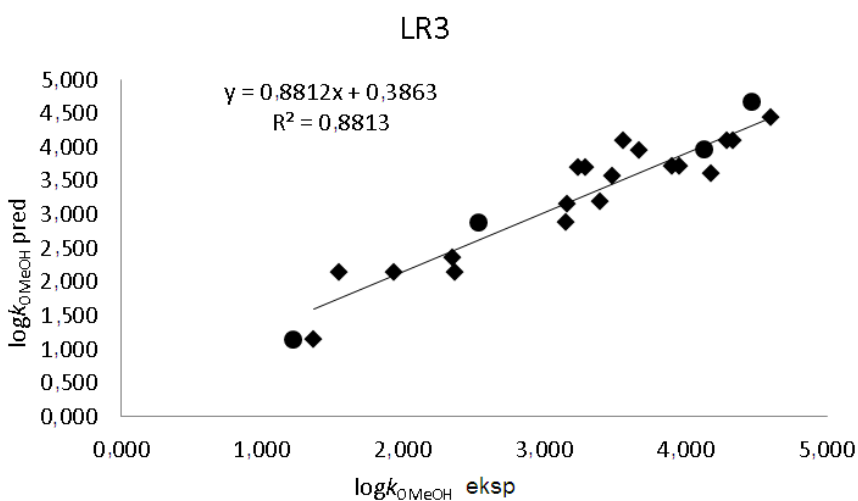
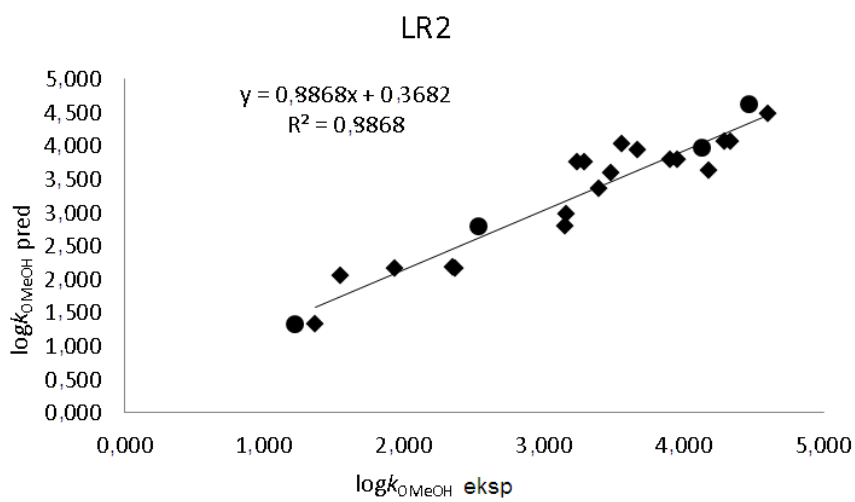
<b>MLR1:</b> $\log k_0 \text{ ACN}^1 = -0,7904(\pm 0,1707) \text{ AClog}S + 0,0208(\pm 0,0089) \text{ PPB} - 0,3355(\pm 0,0926) \text{ CLog}P - 2,1242(\pm 0,4669)$						
<b>MLR2:</b> $\log k_0 \text{ ACN} = -1,1697(\pm 0,1449) \text{ AClog}S + 2,2376(\pm 0,9614) \text{ GPCR} - 0,1874(\pm 0,0736) \text{ CLog}P - 2,3415(\pm 0,5263)$						
<b>MLR3:</b> $\log k_0 \text{ ACN} = -0,9418(\pm 0,2287) \text{ AClog}S + 2,4896(\pm 1,1567) \text{ GPCR} - 0,0016 (\pm 0,0085) \text{ PPB} - 1,7313 (\pm 0,5593)$						
<b>MLR4:</b> $\log k_0 \text{ MeOH}^2 = 0,4048(\pm 0,1067) \text{ miLog}P - 0,4029(\pm 0,0930) \text{ ALOGp}S + 2,2100(\pm 0,6006) \text{ PI} + 1,0650(\pm 0,2013)$						
<b>MLR5:</b> $\log k_0 \text{ MeOH} = 0,5149(\pm 0,0849) \text{ miLog}P + 0,6250(\pm 1,453) \text{ MLOG}P + 2,0272(\pm 0,6026) \text{ PI} + 1,0959(\pm 0,1968)$						
<b>MLR6:</b> $\log k_0 \text{ MeOH} = 0,6707(\pm 0,1365) \text{ miLog}P + 0,2084(\pm 0,1648) \text{ ALOG}P + 2,1717(\pm 0,8572) \text{ PI} + 1,5100(\pm 0,2585)$						
Parametri	MLR1	MLR2	MLR3	MLR4	MLR5	MLR6
	$\log k_0 \text{ ACN}$	$\log k_0 \text{ ACN}$	$\log k_0 \text{ ACN}$	$\log k_0 \text{ MeOH}$	$\log k_0 \text{ MeOH}$	$\log k_0 \text{ MeOH}$
<b>R</b>	0,9352	0,9350	0,9057	0,9791	0,9789	0,9569
<b>R<sup>2</sup></b>	0,8746	0,8742	0,8203	0,9586	0,9583	0,9157
<b>R<sup>2</sup><sub>adj</sub></b>	0,8496	0,8490	0,7844	0,9503	0,9499	0,8989
<b>F</b>	34,89	34,75	22,83	115,64	114,78	54,33
<b>RMSE</b>	0,2120	0,2123	0,2538	0,2105	0,2113	0,3002
<b>p</b>	0,000001	0,000001	0,000008	0,000000	0,000000	0,000000
<b>VIF</b>	4,9 <sub>AClogS</sub>	3,5 <sub>AClogS</sub>	6,1 <sub>AClogS</sub>	5,9 <sub>miLogP</sub>	3,7 <sub>miLogP</sub>	4,7 <sub>miLogP</sub>
	7,7 <sub>PPB</sub>	1,7 <sub>GPCR</sub>	1,8 <sub>GPCR</sub>	5,9 <sub>ALOGpS</sub>	3,6 <sub>MLOGP</sub>	4,7 <sub>ALOGP</sub>
	4,8 <sub>ClogP</sub>	3,0 <sub>ClogP</sub>	4,9 <sub>PPB</sub>	1,1 <sub>PI</sub>	1,1 <sub>PI</sub>	1,1 <sub>PI</sub>
<b>R<sup>2</sup><sub>cv</sub></b>	0,8250	0,7966	0,6733	0,9365	0,9361	0,8566
<b>TSS</b>	5,3767	5,3767	5,3767	16,0390	16,0390	16,0390
<b>PRESS</b>	0,9411	1,0938	1,7568	1,0186	1,0243	2,2992
<b>PRESS/TSS</b>	0,1750	0,2034	0,3267	0,0635	0,0639	0,1434
<b>SD<sub>PRESS</sub></b>	0,2226	0,2399	0,3041	0,2315	0,2322	0,3479
<b>R<sub>test</sub></b>	0,9943	0,9990	0,9848	0,9949	1,0000	0,9962
<b>R<sup>2</sup><sub>test</sub></b>	0,9885	0,9980	0,9699	0,9898	1,0000	0,9924
<b>RMSE<sub>test</sub></b>	0,1427	0,0592	0,2314	0,1866	0,0064	0,1606

<sup>1</sup>ACN – acetonitril; <sup>2</sup>MeOH – methanol. Nazivi statističkih parametara dati su u poglavlju 3.4.5.

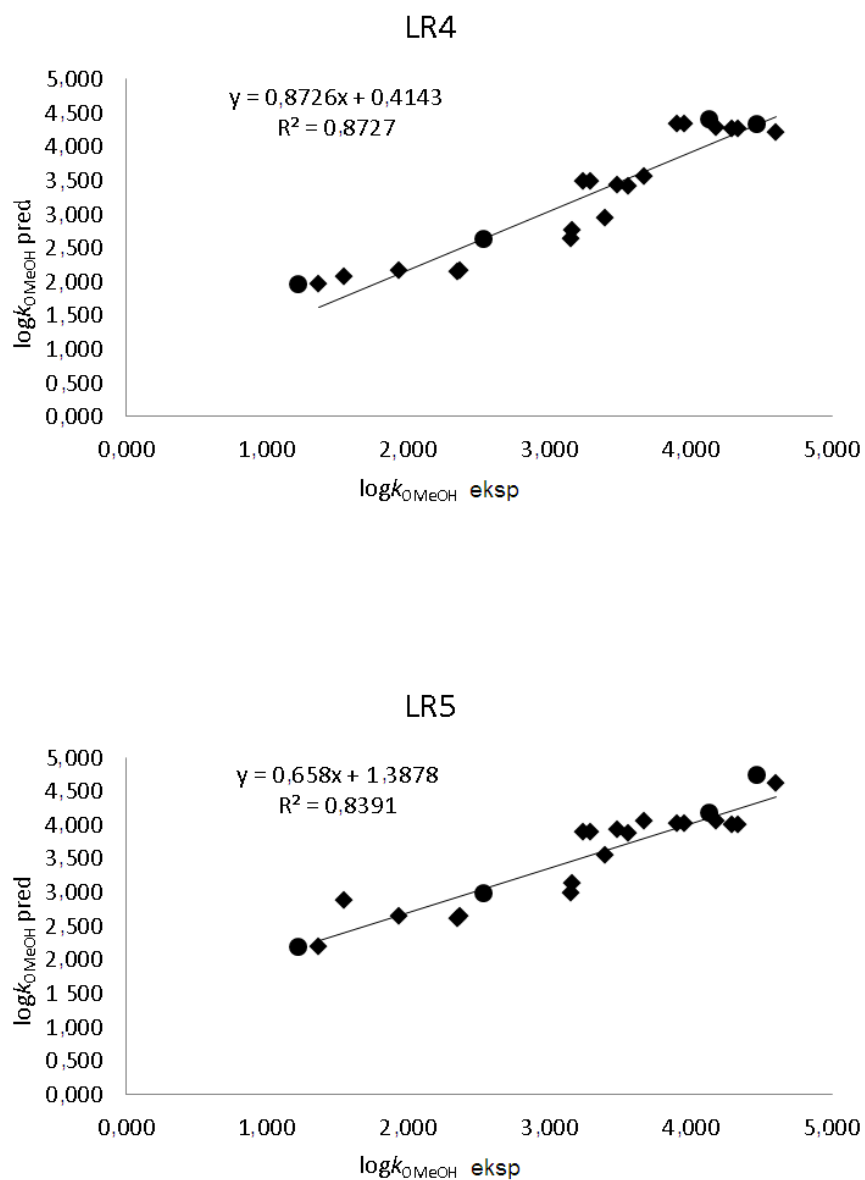
Prediktivna sposobnost utvrđenih LR i MLR modela ispitana je pomoću dva grafičke metode – prikaz eksperimentalnih i predviđenih  $\log k_0$  vrednosti (Slike 4.15 – 4.18) i analiza rezidua (ostataka), (Slike 4.19 – 4.22).



Slika 4.15. Eksperimentalne prema predviđenim  $\log k_o$  vrednostima za LR1 model za pokretnu fazu *acetonitril-voda* (ACN) (♦ kalibracioni set; • test set)

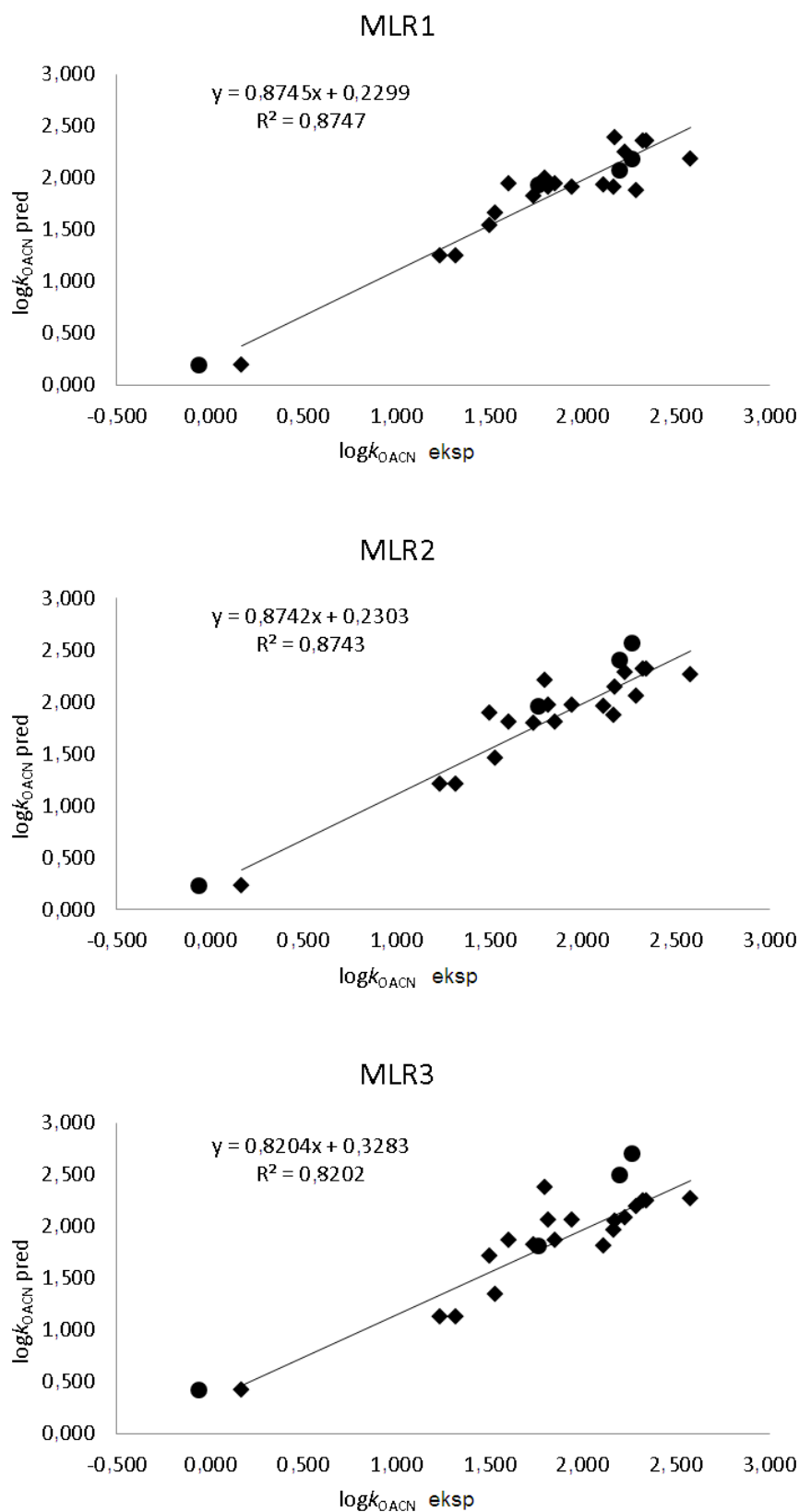


Slika 4.16a. Eksperimentalne prema predviđenim  $\log k_o$  vrednostima za LR2 i LR3 modele za pokretnu fazu *metanol-voda* (MeOH) (♦ kalibracioni set; • test set)



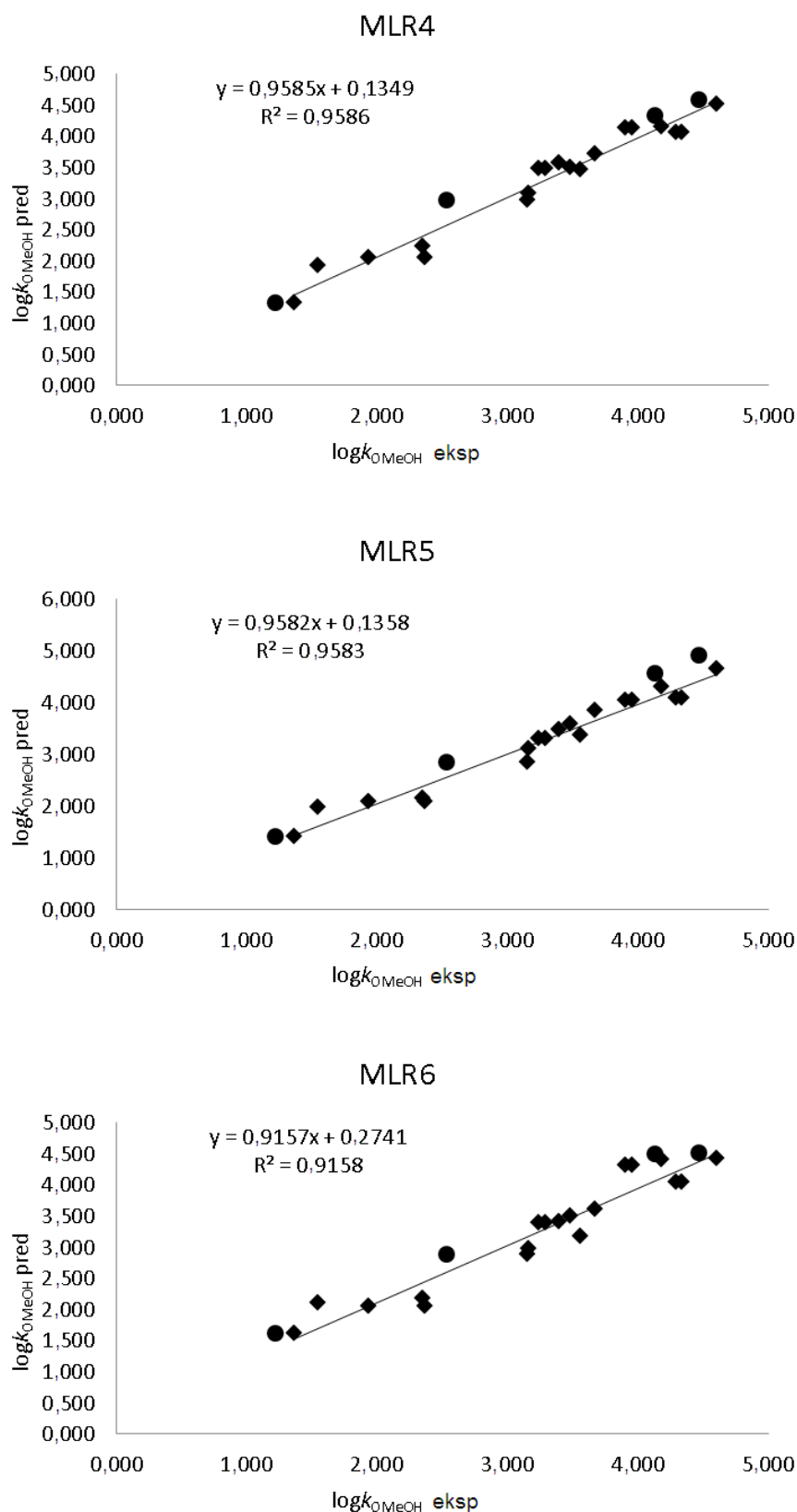
Slika 4.16b. Eksperimentalne prema predviđenim  $\log k_o$  vrednostima za LR4 i LR5 modele za pokretnu fazu *metanol-voda* (MeOH)

(◆ kalibracioni set; ● test set)



Slika 4.17. Eksperimentalne prema predviđenim  $\log k_o$  vrednostima za MLR1 – MLR3 modele za pokretnu fazu *acetonitril-voda* (ACN)

(♦ kalibracioni set; • test set)

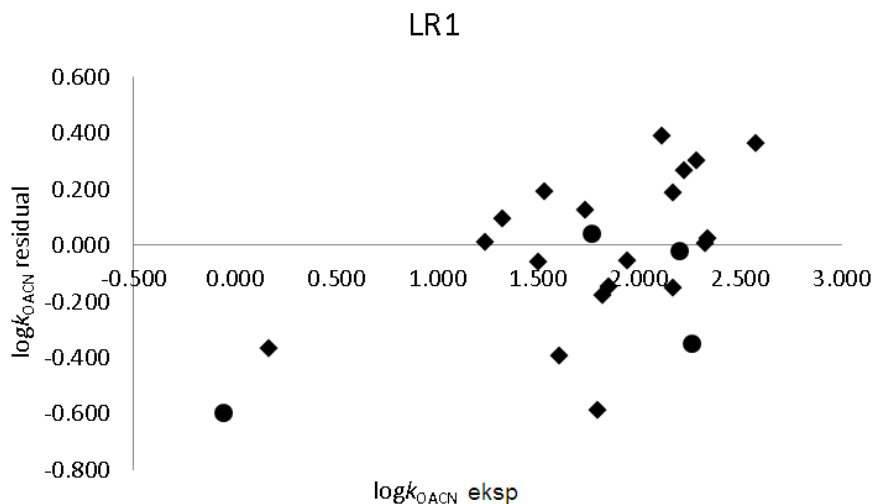


Slika 4.18. Eksperimentalne prema predviđenim  $\log k_o$  vrednostima za MLR4 – MLR6 modele za pokretnu fazu *metanol-voda* (MeOH)

(◆ kalibracioni set; ● test set)

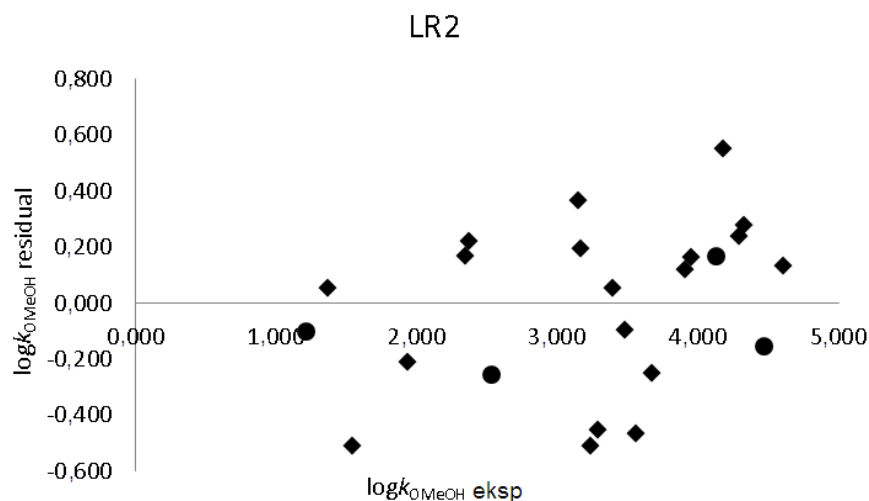


Sa *Slika 4.15 – 4.18* vidi se da postoji dobra korelacija između eksperimentalno dobijenih i predviđenih retencionih podataka  $\log k_o$ . To se naročito odnosi na pokretnu fazu sa metanolom (*Slike 4.16 i 4.18*). Za LR modele  $R^2$  iznosi 0,8391 – 0,8868, a za MLR  $R^2$  je 0,9158 – 0,9586. Dakle, kako se i očekivalo, kvalitetniji su MLR modeli. Kod MLR4 – MLR6 nagib teži jedinici, a odsečak se približava nuli. Sve rezidue su nasumično raspoređene oko nule na y osi što ukazuje da postoji nasumična greška predviđanja odnosno nepredvidivost ostataka (*Slike 4.19 – 4.22*).



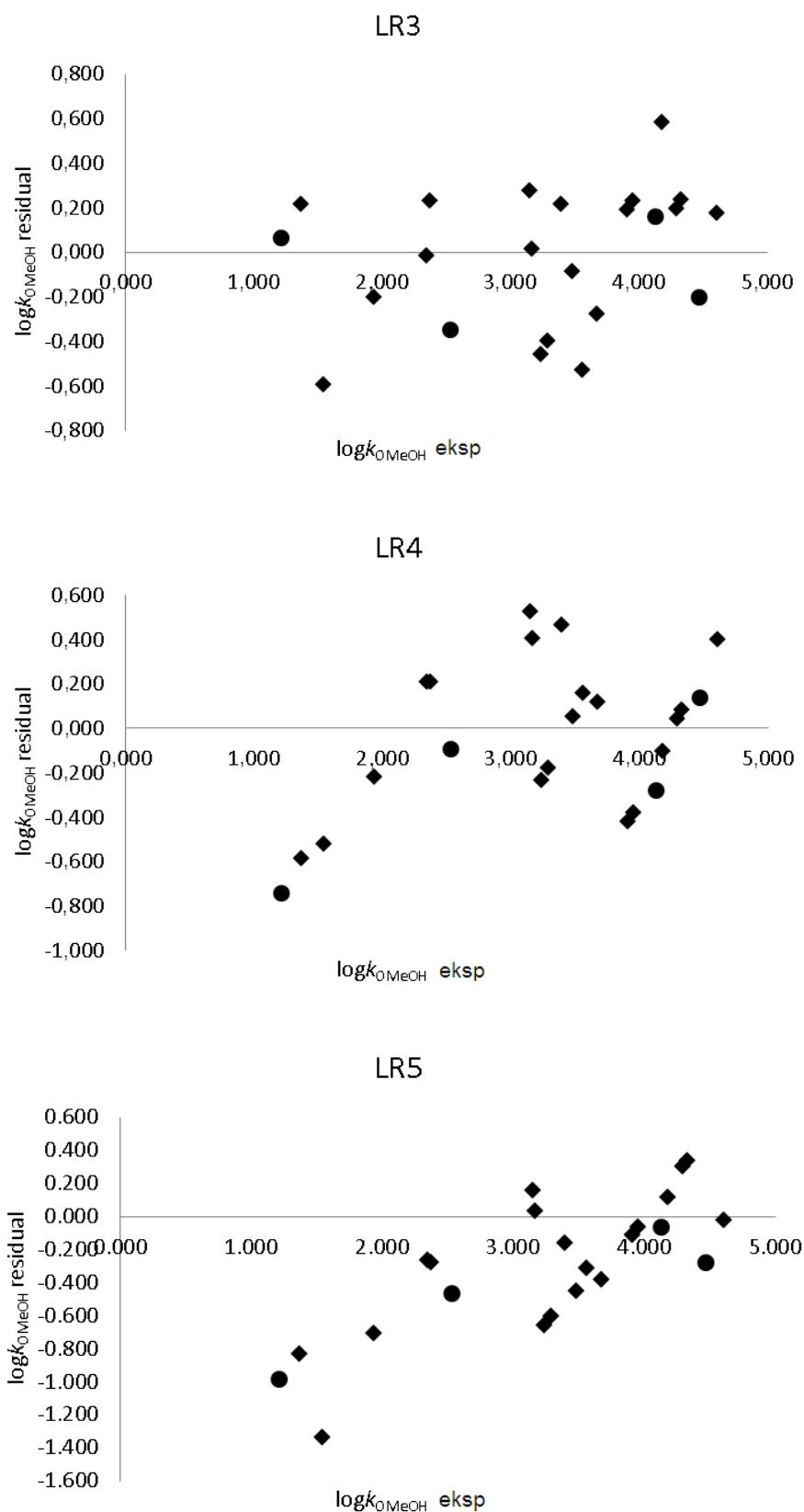
*Slika 4.19.* Eksperimentalne prema rezidualnim  $\log k_o$  vrednostima za LR1 model za pokretnu fazu *acetonitril-voda* (ACN)

(♦ kalibracioni set; ● test set)



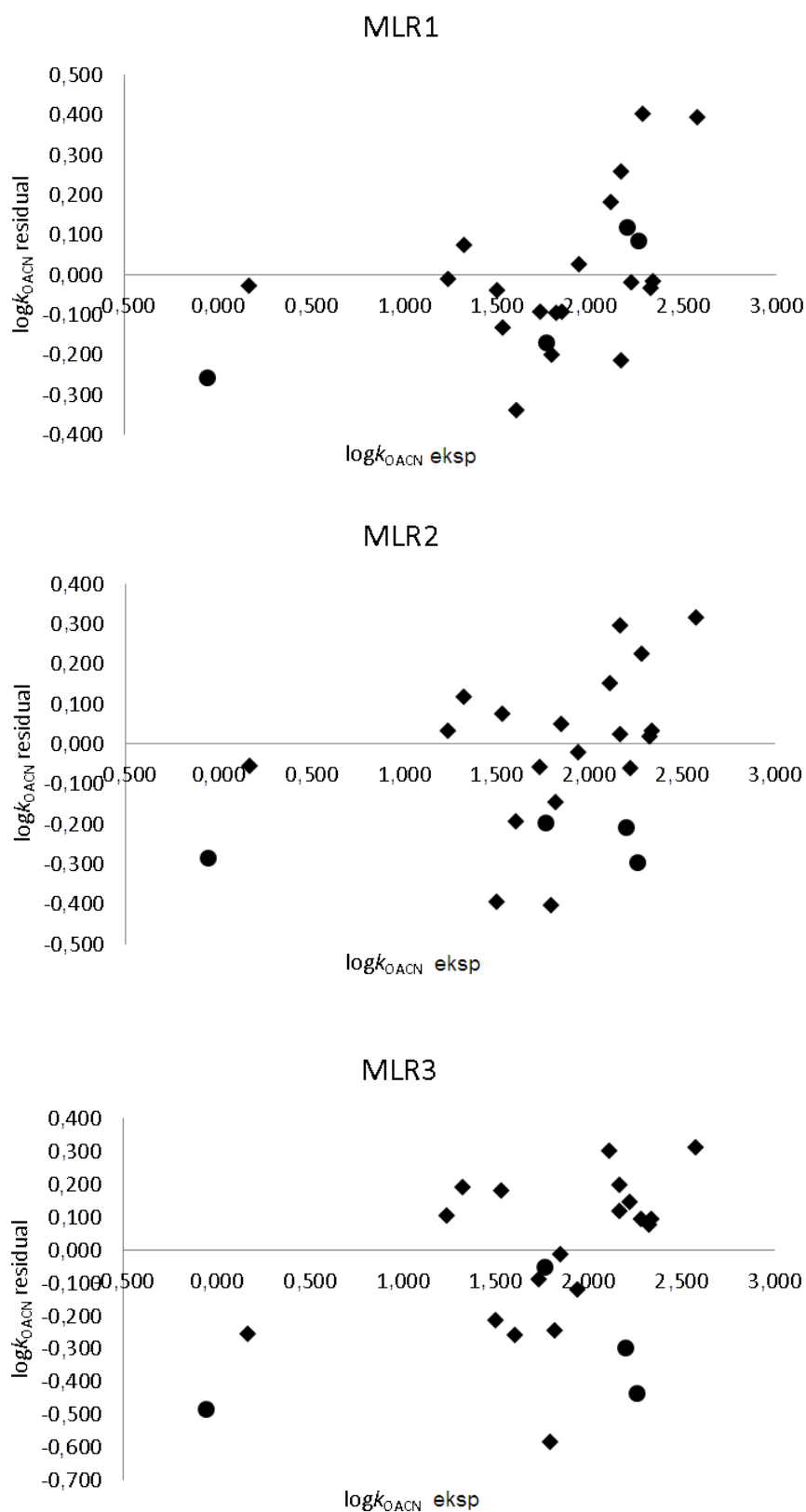
*Slika 4.20a.* Eksperimentalne prema rezidualnim  $\log k_o$  vrednostima za LR2 model za pokretnu fazu *metanol-voda* (MeOH)

(♦ kalibracioni set; ● test set)



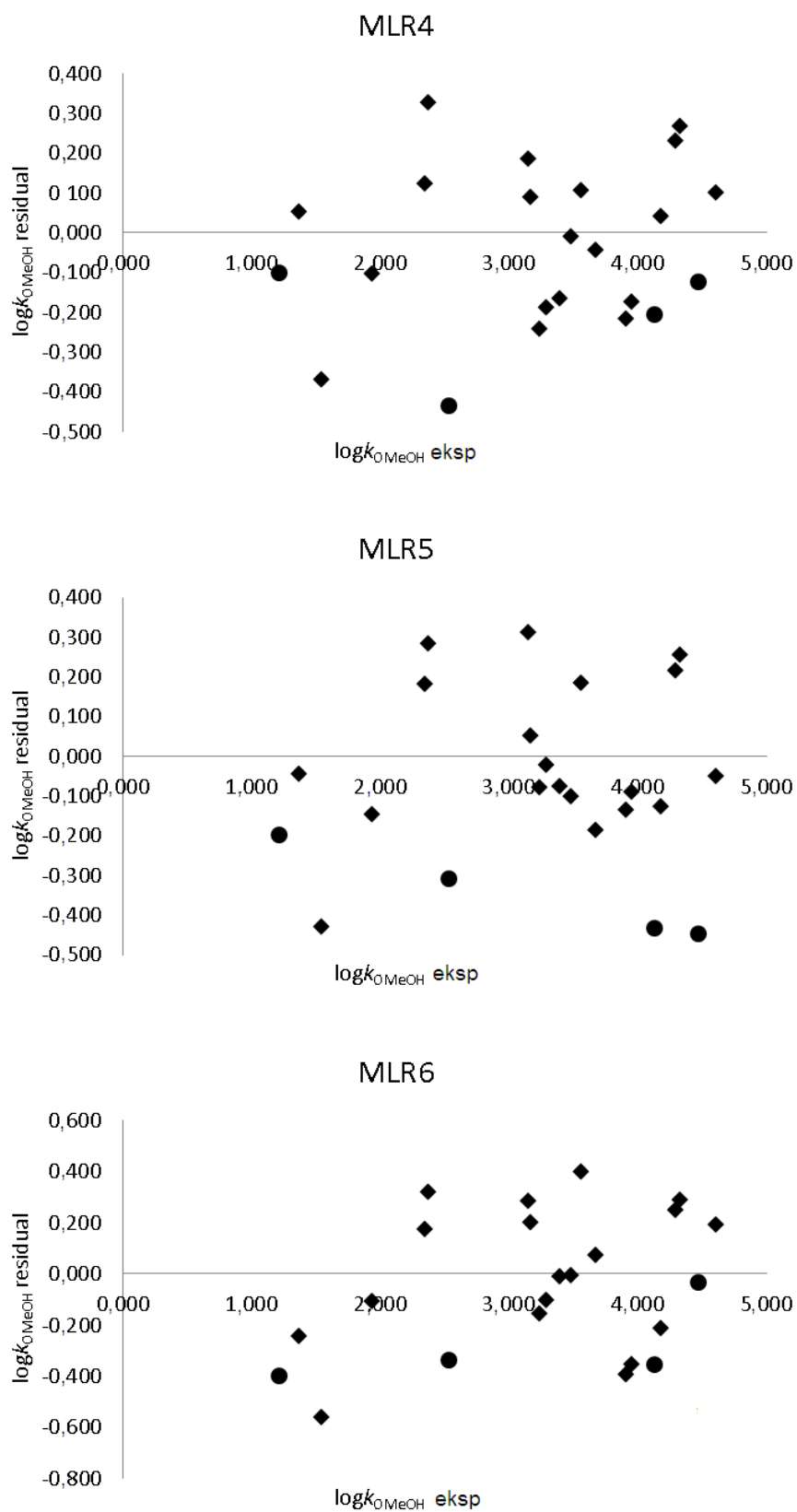
Slika 4.20b. Eksperimentalne prema rezidualnim  $\log k_o$  vrednostima za LR3 – LR5 modele za pokretnu fazu *metanol-voda* (MeOH)

(◆ kalibracioni set; ● test set)



Slika 4.21. Eksperimentalne prema rezidualnim  $\log k_o$  vrednostima za MLR1 – MLR3 modele za pokretnu fazu *acetonitril-voda* (ACN)

(◆ kalibracioni set; ● test set)



Slika 4.22. Eksperimentalne prema rezidualnim  $\log k_o$  vrednostima za MLR4 – MLR6 modele za pokretnu fazu *metanol-voda* (MeOH)

(◆ kalibracioni set; ● test set)

Iz prikazanih rezultata (Tabele 4.5 i 4.6; Slike 4.15 – 4.18) očigledno je da su bolji i LR i MLR modeli za predviđanje retencije  $\log k_o$  izvedeni za hromatografski sistem metanol-voda (Slike 4.16 i 4.18) od modela za sistem acetonitril-voda (Slike 4.15 i 4.17). MLR modeli su statistički značajniji i imaju prednost za predviđanje hromatografske lipofilnosti ispitivanih prirodnih i sintetisanih stiril laktona (Slika 4.18). Svi dobijeni QSRR modeli mogu se koristiti i za predviđanje hromatografske lipofilnosti sličnih jedinjenja i njihovog hromatografskog ponašanja. Takođe, oni mogu biti upotrebljeni za utvrđivanje fizičko-hemijskog profila stiril laktona kao budućih potencijalnih antitumorskih agenasa.

### 4.3. QSPKR analiza farmakokinetičkih osobina stiril laktona

#### 4.3.1. Korelacija *in silico* farmakokinetičkih parametara i retencionih konstanti lipofilnosti

Prioritetan i najčešći način unošenja leka u organizam jeste oralna administracija. Otuda je značajno *a priori* predviđanje intestinalne apsorpcije i raspodele u tkivu prethodno dizajniranih farmaceutika. Prvi korak u tome, naravno samo kao minimalan kriterijum, jeste primena „pravila od 5” Lipinskog i saradnika (2001), najpopularnijeg filtera za ADME osobine potencijalnih farmaceutskih agenasa. Fizičko-hemijske osobine ispitivanih stiril laktona, obuhvaćene „pravilom od 5” Lipinskog i izračunate online programom *I-Lab 2.0* (ACD/Lab I-Lab 2.0), prikazane su u Tabeli 4.7.

Iz Tabele 4.7 se vidi da samo dicinamat, jedinjenje **IV.5**, ima dva odstupanja od pravila Lipinskog ( $MW > 500$ ,  $ClogP > 5$ ), zbog čega nije razmatrano u daljim analizama. Za ostale molekule može se pretpostaviti da imaju dobru apsorpciju.

Da bi se analizirao uticaj lipofilnosti na biološku aktivnost ispitivanih stiril laktona, obe lipofilne konstante određene hromatografskom analizom,  $\log k_o$  i  $S$ , korelirane su sa *in silico* farmakokinetičkim parametrima: konstanta apsorpcije,  $k_a$ , zapremina distribucije,  $V_d$ , humana efektivna permeabilnost u jejunumu,  $Pe_{eff}$ , nevezana frakcija jedinjenja,  $FUP$ , vezivanje za proteine plazme,  $PPB$ , logaritam podeonog koeficijenta krvno-moždane barijere,  $\log BB$  (Tabela 4.8), humana intestinalna apsorpcija,  $HIA$ , propustljivost ćelija adenokarcinoma kolona, *Caco-2* (Prilog, Tabela P-7.4). Navedeni farmakokinetički prediktori stiril laktona, izračunati su *in silico* različitim verzijama *ACD/Lab I-Lab 2.0* programa (Tabela 4.8) i *PreADMET* programom (Prilog, Tabela P-7.4).

U analizama su korišćene hromatografske lipofilne konstante  $\log k_o$  i  $S$  dobijene sa sistemom metanol-voda s obzirom na to da su u QSRR modelovanju  $\log k_o$  bolji linearni i multi linearni regresioni modeli dobijeni sa tim sistemom (Tabele 4.5, 4.6; Slike 4.16, 4.18).

Rezultati su obrađeni programom OriginPro8 (Microsoft).

Tabela 4.7. Fizičko-hemijske osobine ispitivanih stiril laktone obuhvaćene “pravilom od 5” Lipinskog (2001), (I-Lab 2.0)

Jedinjenje	Fizičko-hemijski parametri				Odstupanja
	MW < 500	HBD < 5	HBA < 10	ClogP < 5	
I.1	250,25	2	5	0,019	0
I.2	250,25	2	5	0,019	0
I.3	340,37	1	5	1,175	0
II.1	276,24	0	6	-0,042	0
II.2	292,28	0	6	-0,265	0
II.3	262,26	0	5	-0,104	0
II.4	262,26	0	5	-0,104	0
II.5	332,30	0	7	0,396	0
II.6	332,30	0	7	0,396	0
II.7	350,29	0	7	0,539	0
III.1	380,39	1	6	2,340	0
III.2	410,42	1	7	2,259	0
III.3	398,38	1	6	2,248	0
III.4	410,42	1	7	2,259	0
III.5	425,39	1	9	2,083	0
III.6	364,39	0	5	3,536	0
III.7	382,38	0	5	3,679	0
IV.1	380,39	1	6	2,419	0
IV.2	425,39	1	9	2,162	0
IV.3	410,42	1	7	2,338	0
IV.4	398,38	1	6	2,562	0
IV.5	<b>510,53</b>	0	7	<b>5,335</b>	<b>2</b>
IV.6	425,39	1	9	2,162	0
IV.7	410,42	1	7	2,338	0

MW – molekulska masa; HBD – broj donorskih vodoničnih veza; HBA – broj akceptorskih vodoničnih veza; ClogP – izračunati logaritam podelnog koeficijenta oktanol-voda (parametar lipofilnosti)

Tabela 4.8. *In silico* određeni farmakokinetički parametri stiril laktona (I-Lab 2.0)

Jed.	Farmakokinetički parametri					
	$k_a$ min <sup>-1</sup>	Vd L/kg	$Pe_{ff}$ (pH 6,5) cm/s	FUP	PPB %	logBB
I.1	0,041	0,86	0,000599	0,62	18,58	0,12
I.2	0,041	0,86	0,000599	0,62	18,58	0,12
I.3	0,053	1,25	0,000780	0,08	64,02	0,64
II.1	0,060	0,89	0,000871	0,16	59,84	0,41
II.2	0,057	1,06	0,000838	0,26	36,47	0,39
II.3	0,060	1,09	0,000875	0,12	64,99	0,46
II.4	0,060	1,09	0,000875	0,12	64,99	0,46
II.5	0,056	1,05	0,000811	0,13	51,75	0,55
II.6	0,056	1,05	0,000811	0,13	51,75	0,55
II.7	0,055	1,08	0,000808	0,14	49,47	0,57
III.1	0,052	1,39	0,000756	0,07	66,71	0,64
III.2	0,051	1,37	0,000740	0,05	67,85	0,77
III.3	0,052	1,43	0,000755	0,05	62,05	0,77
III.4	0,051	1,37	0,000740	0,05	67,85	0,77
III.5	0,051	1,24	0,000741	0,07	75,73	0,54
III.6	0,052	1,89	0,000756	0,03	96,93	0,05
III.7	0,052	1,94	0,000763	0,02	95,72	0,37
IV.1	0,052	1,53	0,000757	0,05	80,30	0,63
IV.2	0,051	1,47	0,000742	0,05	85,16	0,46
IV.3	0,051	1,52	0,000740	0,04	79,46	0,76
IV.4	0,052	1,54	0,000756	0,05	76,57	0,67
IV.5	0,047	2,48	0,000684	0,01	98,27	0,55
IV.6	0,051	1,47	0,000742	0,05	85,16	0,46
IV.7	0,051	1,52	0,000740	0,04	79,46	0,76

$k_a$  – konstanta apsorpcije;  $V_d$  – zapremina distribucije;  $Pe_{ff}$  – humana efektivna permeabilnost u jejunumu; FUP – nevezana (slobodna) frakcija jedinjenja; PPB – vezivanje za proteine plazme; logBB – logaritam podeonog koeficijenta krvno-moždane barijere

Sva ispitivana jedinjenja imaju male konstante apsorpcije,  $k_a$  ( $0,041 - 0,06 \text{ min}^{-1}$ ), posebno stereoizomeri **I.1** i **I.2** sa polarnom  $-\text{OH}$  grupom (Tabela 4.8). Ove niske vrednosti  $k_a$  ukazuju na prilično kratko polu-vreme apsorpcije. Naime, prema Perišić-Janjić i sar. (2013) predviđeno polu-vreme apsorpcije za jedinjenja čije su  $k_a$   $0,041 - 0,061 \text{ min}^{-1}$  iznosi 11 do 16,5 minuta.

Statistički značajne korelacije  $k_a$  i hromatografskih lipofilnih konstanti  $\log k_o$  i  $S$ , u koje nisu uključena jedinjenja **I.1**, **I.2** i **IV.5**, jesu linearne sa  $R^2_{\text{adj}}$  nešto iznad 0,7 (jednačine 4.1 i 4.2), a nešto bolje su krivolinijske sa  $R^2_{\text{adj}}$  oko 0,8 (jednačine 4.3, 4.4; Slike 4.23 i 4.24):

$$k_a = -0,0033(\pm 0,0004) \log k_o + 0,0648(\pm 0,0015) \quad (4.1)$$

$$R^2_{\text{adj}} = 0,7358; F = 56,70; p = 4,07 \cdot 10^{-7}$$

$$k_a = 0,0032(\pm 0,0078) S + 0,0689(\pm 0,0019) \quad (4.2)$$

$$R^2_{\text{adj}} = 0,7621; F = 65,08; p = 1,48 \cdot 10^{-7}$$

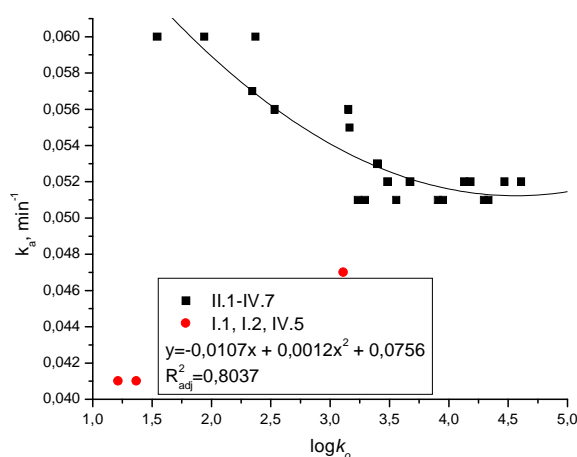
$$k_a = -0,0107(\pm 0,0027) \log k_o + 0,0012(\pm 0,0004) (\log k_o)^2 + 0,0756(\pm 0,0041) \quad (4.3)$$

$$R^2_{\text{adj}} = 0,8037; F = 41,95; p = 1,67 \cdot 10^{-7}$$

$$k_a = 0,0148(\pm 0,0035) S + 0,0013(\pm 0,0004) S^2 + 0,0940(\pm 0,0078) \quad (4.4)$$

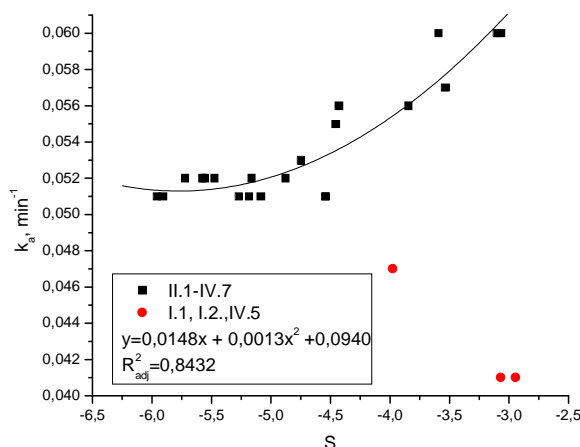
$$R^2_{\text{adj}} = 0,8432; F = 54,76; p = 2,22 \cdot 10^{-8}$$

Iz jednačina 4.1 – 4.4 i Slike 4.24 vidi se da hromatografski parametar lipofilnosti  $S$  bolje korelira sa  $k_a$  od  $\log k_o$ .



Slika 4.23. Zavisnost između retencione konstante  $\log k_o$  i konstante apsorpcije,  $k_a$  (jednačina 4.3)





Slika 4.24. Zavisnost između retencione konstante  $S$  i konstante apsorpcije,  $k_a$  (jednačina 4.4)

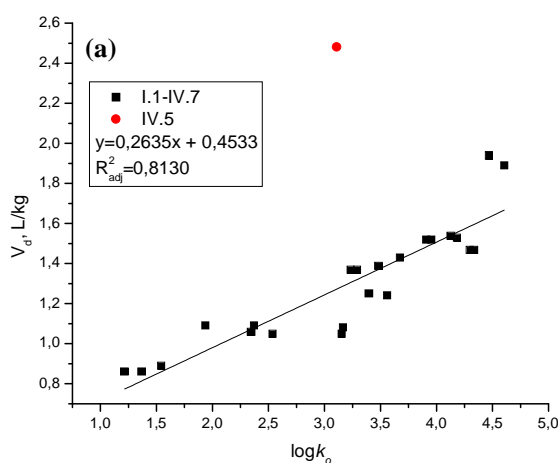
Zapremina distribucije ( $V_d$ ) iako nema direktno fizičko ili anatomsko značenje, veoma je značajan farmakokinetički parametar molekula jer predstavlja meru relativne raspodele leka između plazme i ćelija. Stiril laktone imaju male ili umerene vrednosti  $V_d$ , koje su ispod 2 L/kg, izuzev jedinjenja **IV.5**. Lipofilnija jedinjenja, tj. jedinjenja III i IV grupe, koja imaju veće retencione konstante  $\log k_o$  (Prilog, Tabela P-7.1) imaju i veće  $V_d$  (Tabela 4.8). Dobijene su relativno dobre ( $R^2_{adj} > 0,8$ ), i linearna (jednačina 4.5) i krivolinijska (jednačina 4.6) korelacija  $V_d$  sa hromatografskom konstantom lipofilnosti  $\log k_o$  (Slika 4.25):

$$V_d = 0,2635(\pm 0,0268) \log k_o + 0,4533(\pm 0,0904) \quad (4.5)$$

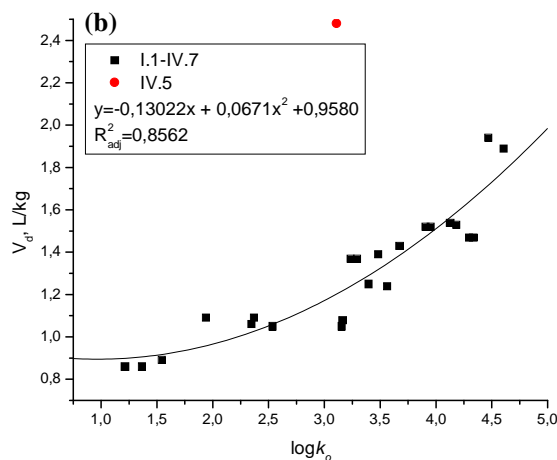
$$R^2_{adj} = 0,8130; F = 96,66; p = 2,60 \cdot 10^{-9}$$

$$V_d = -0,1302(\pm 0,1476) \log k_o + 0,0671(\pm 0,0248) (\log k_o)^2 + 0,9580(\pm 0,2029) \quad (4.6)$$

$$R^2_{adj} = 0,8562; F = 66,50; p = 1,46 \cdot 10^{-9}$$



Slika 4.25a. Zavisnosti između konstanti  $\log k_o$  i zapremine distribucije,  $V_d$  (jednačina 4.5)



Slika 4.25b. Zavisnosti između konstanti  $\log k_o$  i zapremine distribucije,  $V_d$  (jednačina 4.6)

Jedan od parametara oralne apsorpcije leka jeste *efektivna intestinalna membranska apsorpcija u jejunumu*,  $Pe_{eff}$ . Ispitivani stiril laktoni apsorbuju se pasivnom transcelularnom permeacijom (ACD/Lab I-Lab 2.0), tj. difuzijom kroz lipidni dvosloj ćelijske membrane. Otuda, permeabilnost molekula zavisi od lipofilnosti. Prema očekivanju, najniže vrednosti  $Pe_{eff}$  imaju najpolarnija odnosno najmanje lipofilna jedinjenja **I.1** i **I.2**. Na osnovu vrednosti  $Pe_{eff}$  očekuje se bolja permeabilnost tricikličnih stiril laktona (jedinjenja II grupe) budući da ona imaju najveće  $Pe_{eff}$  vrednosti (Tabela 4.8).

Ako se koreliraju *in silico* vrednosti  $Pe_{eff}$ , bez jedinjenja **I.1** i **I.2** kao i **IV.5**, i hromatografski parametri lipofilnosti  $\log k_o$  i  $S$ , značajnija je korelacija sa konstantom  $S$  i to parabolična (jednačina 4.7):

$$Pe_{eff} = 2,16 \cdot 10^{-4} (\pm 5,51 \cdot 10^{-5}) S + 1,86 \cdot 10^{-5} (\pm 6,07 \cdot 10^{-6}) S^2 + ,37 \cdot 10^{-3} (\pm 1,24 \cdot 10^{-4}) \quad (4.7)$$

$$R^2_{adj} = 0,8265; F = 48,64; p = 5,51 \cdot 10^{-8}$$

Efekat leka zavisi od koncentracije njegovog slobodnog oblika zbog čega je poznavanje *nevezane frakcije (FUP)* značajno. Najlipofilnija jedinjenja, krasalaktoni B i C i njihovi derivati (jedinjenja III i IV grupe), imaju najmanje vrednosti  $FUP$  (0,02 – 0,07). To je i očekivano s obzirom na to da se lipofilnija jedinjenja lakše vezuju za proteine plazme od manje lipofilnih. Iz tog razloga u plazmi ima više slobodne/nevezane frakcije manje lipofilnih

jedinjenja II grupe (FUP 0,12 – 0,16). Kada se *FUP* korelira sa lipofilnim hromatografskim parametrima  $\log k_o$  i *S*, nešto značajnija korelacija je sa  $\log k_o$  i to krivolinijska (*jednačina 4.8*):

$$\begin{aligned} \text{FUP} &= -0,5092(\pm 0,1129) \log k_o + 0,0656(\pm 0,1129) (\log k_o)^2 + 1,0244(\pm 0,1553) \\ R^2_{\text{adj}} &= 0,7238; F = 29,82; p = 9,98 \cdot 10^{-7} \end{aligned} \quad (4.8)$$

Afinitet jedinjenja prema proteinima plazme je veoma značajan jer procenat vezanog jedinjenja za proteine plazme određuje efektivnu koncentraciju leka. Lek vezan za proteine plazme nije aktivan, tj. ne može da prođe kroz membrane i da na kraju dođe do mesta delovanja niti da se veže za receptore (Kratochwil i sar, 2001). *Frakcija vezana za proteine plazme (PPB)* izražava se kao procenat ukupno prisutnog leka/jedinjenja u organizmu koji je privremeno neaktivan.

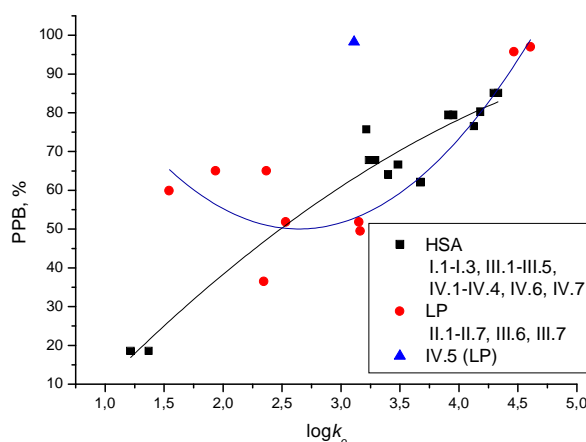
Od ispitivanih stiril laktone neutralne supstance su triciklični analozi **II.1 – II.7**, deoksigenovane izostere **III.6** i **III.7** kao i dicinamat **IV.5**. Ova jedinjenja većinom se vezuju za lipoproteine a manjim delom za albumin. Ostala jedinjenja (**I.1 – I.3**, **III.1 – III.5**, **IV.1 – IV.4**, **IV.6**, **IV.7**) imaju konstnte kiselosti  $pK_a$  od 12,60 do 13,0 (*Tabela 4.1*) i vezuju se za human serum albumin, HAS (I-Lab 2.0). Iz tog razloga su korelacije parametra *PPP* (*Tabela 4.8*) sa hromatografskim lipofilnim parametrima  $\log k_o$  i *S* urađene odvojeno za jedinjenja koja se vezuju za lipoproteine (LP) i ona koja se vezuju za HSA (*jednačine 4.9 – 4.12*, *Slike 4.26* i *4.27*).

$$\begin{aligned} \text{PPB (HAS)} &= 21,5948(\pm 1,2720) \log k_o - 7,8230(\pm 4,5244) \\ R^2_{\text{adj}} &= 0,9567; F = 288,23; p = 9,36 \cdot 10^{-10} \end{aligned} \quad (4.9)$$

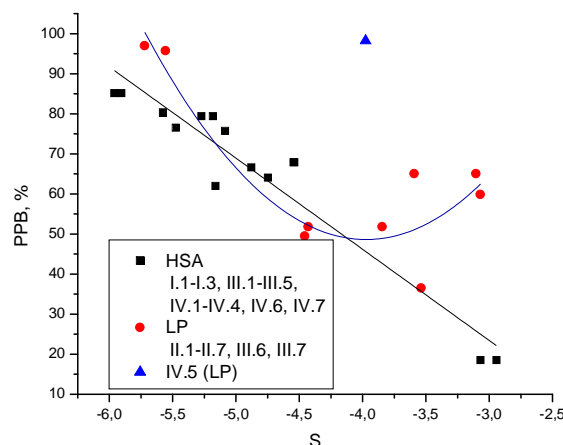
$$\begin{aligned} \text{PPB (LP)} &= 67,0005(\pm 23,1618) \log k_o + 12,6725(\pm 23,1618) (\log k_o)^2 + 138,5872(\pm 34,0701) \\ R^2_{\text{adj}} &= 0,7811; F = 15,22; p = 4,42 \cdot 10^{-3} \end{aligned} \quad (4.10)$$

$$\begin{aligned} \text{PPB (HAS)} &= -22,7490(\pm 1,9506) S - 44,8120(\pm 9,6746) \\ R^2_{\text{adj}} &= 0,9122; F = 136,01; p = 6,64 \cdot 10^{-8} \end{aligned} \quad (4.11)$$

$$\begin{aligned} \text{PPB (LP)} &= 134,5938(\pm 38,8862) S + 16,9402(\pm 4,3988) S^2 + 345,9703(\pm 82,4828) \\ R^2_{\text{adj}} &= 0,8022; F = 17,22; p = 3,27 \cdot 10^{-3} \end{aligned} \quad (4.12)$$



Slika 4.26. Zavisnost između retencione konstante  $\log k_o$  i prediktora vezivanja za proteine plazme,  $PPB$  (jednačine 4.9, 4.10), (I-Lab 2.0)



Slika 4.27. Zavisnost između retencione konstante  $S$  i prediktora vezivanja za proteine plazme,  $PPB$  (jednačine 4.11, 4.12), (I-Lab 2.0)

Rezultati prikazani na Slikama 4.26 i 4.27 i jednačinama 4.9 i 4.11 ukazuju da postoji visoka linearna korelacija između deskriptora  $PPB$  i hromatografskih parametara lipofilnosti  $\log k_o$  i  $S$  kod stiril laktone koji se vezuju za albumin ( $R^2_{adj} > 0,9$ ). Međutim, kod stiril laktone koji se vezuju za lipoproteine ta veza je krivolinijska sa  $R^2_{adj}$  oko 0,8 (jednačine 4.10 i 4.12).

Vrednosti  $PPB$  računane su i programom *PreADMET* (online program) (Prilog, Tabela P-7.4). Dobijene vrednosti bitno se razlikuju u odnosu na one izračunate ACD/Lab *I-Lab 2.0* programom (Tabela 4.8). Kada se koreliraju  $PPP$  vrednosti (*PreADMET*) sa  $\log k_o$  i  $S$

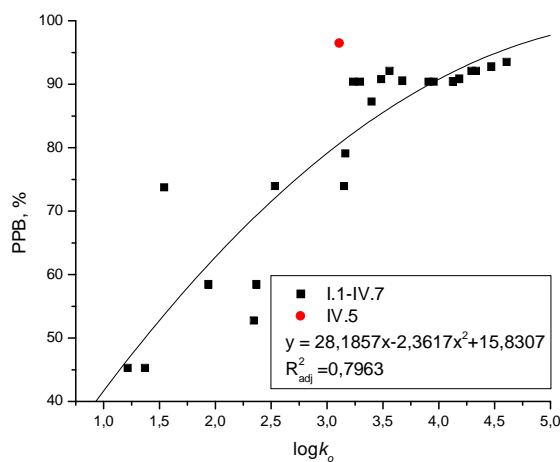
vrednostima za sve molekule, zavisnosti su krivolinijske sa  $R^2_{\text{adj}}$  oko 0,8 (jednačine 4.13 i 4.14, Slike 4.28 i 4.29).

$$\text{PPB} = 28,1857(\pm 9,7000) \log k_o - 2,3617(\pm 1,6344) (\log k_o)^2 + 15,8307(\pm 13,3496) \quad (4.13)$$

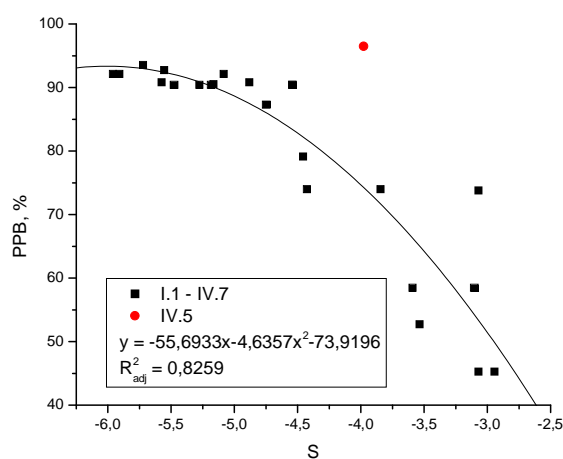
$$R^2_{\text{adj}} = 0,7963; F = 44,00; p = 4,74 \cdot 10^{-8}$$

$$\text{PPB} = -55,6933(\pm 16,2066) S - 6,6357(\pm 1,8302) S^2 - 73,9200(\pm 34,5242) \quad (4.14)$$

$$R^2_{\text{adj}} = 0,8259; F = 53,19; p = 9,84 \cdot 10^{-9}$$



Slika 4.28. Zavisnost između retencione konstante  $\log k_o$  i prediktora vezivanja za proteine plazme, PPB (PreADMET), (jednačina 4.13)



Slika 4.29. Zavisnost između retencione konstante  $S$  i prediktora vezivanja za proteine plazme, PPB (PreADMET), (jednačina 4.14)

Krvno-moždana barijera (*BBB*) reguliše razmenu jedinjenja između krvi i mozga. Za efikasnost jedinjenja koja izazivaju antikonvulzivnu aktivnost, penetracija kroz krvno-moždanu barijeru je od velikog značaja. Međutim, za ostale terapeutike poželjno je da ne penetriraju, ili da u što manjoj meri penetriraju u mozak.

Da bi se preliminarno utvrdilo da li su ispitivani prirodni i novosintetizovani stiril laktoni skloni moždanoj penetraciji, primenjena su Clarkova „pravila palca” (Clark, 2003), (*Tabela 4.9*).

Na osnovu rezultata iz *Tabele 4.9* vidi se da sva jedinjenja odstupaju u po jednom (**I.3**, **II.3**, **II.4**) do četiri (**III.2 – III.5**, **IV.1 – IV.4**, **IV.6**, **IV.7**) „pravila palca” (odstupanja su posebno naglašena podebljanim brojevima). Iz tog razloga se ne očekuje njihova visoka penetracija u mozak. Karakteristično je da svi molekuli „krše” pravilo po kome se preporučuje da razlika vrednosti parametra lipofilnosti *ClogP* i zbira broja atoma kiseonika i azota u molekulu (*N+O*) bude veća od nule. Jedinjenje **IV.5**, koje se kako je već rečeno ne uklapa ni u „pravila od 5”, odstupa po svim „pravilima palca”.

Relativan afinitet molekula za ćelije krvi ili mozga izražava se logaritmom krvno-moždanog podeonog koeficijenta, *logBB* (*logBBB*). Većina lekova koji imaju uticaj na centralni nervni sistem ima *logBB* preko 1 (Milošević i sar., 2014b).

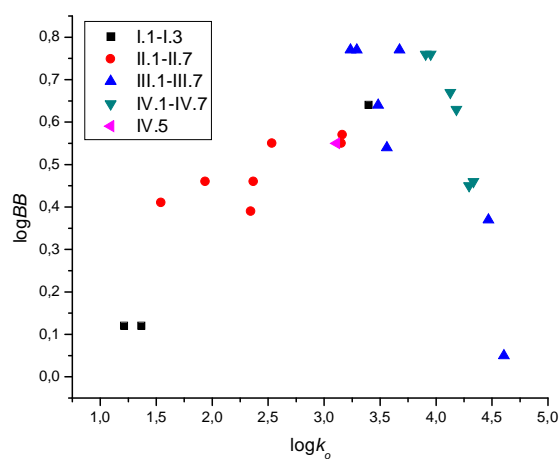
Vrednosti parametra *logBB* ispitivanih stiril laktona su u intervalu 0,05 – 0,77 (*I-Lab 2.0*), (*Tabela 4.8*) odnosno 0,0324 – 0,9926 (*PreADMET*), (Prilog, *Tabela P-7.4*). Na osnovu vrednosti ovog prediktora, dobijenih *I-Lab 2.0* programom, može se zaključiti da se svi molekuli umereno apsorbuju kroz krvno-moždanu barijeru. Prema *PreADMET* izračunavanju, među ispitivanim stiril laktonima ima onih sa slabom apsorpcijom kroz krvno-moždanu barijeru (*BBB* < 0,1) i onih sa umerenom apsorpcijom kroz krvno-moždanu barijeru (*BBB* 0,1 – 1,0), (Prilog, *Tabela P-7.4*). S obzirom na to da su ovi stiril laktoni pokazali antiproliferativnu aktivnost prema više ćelijskih linija kancera dojke, grlića materice, Burkittovog limfoma (Benedeković i sar., 2014a; 2014b), a u našim istraživanjima prema ćelijskim linijama adenokarcinoma pluća, melanoma, karcinoma debelog creva i prostate nisu se ni očekivale visoke vrednosti *BBB*.

Korelacije *logBB*, bez obzira kojim su programom računate, sa hromatografskim lipofilnim koeficijentima *logk<sub>o</sub>* i *S* su loše (*Slike 4.30 – 4.33*) što je posledica navedenih osobina jedinjenja (*Tabela 4.7*).

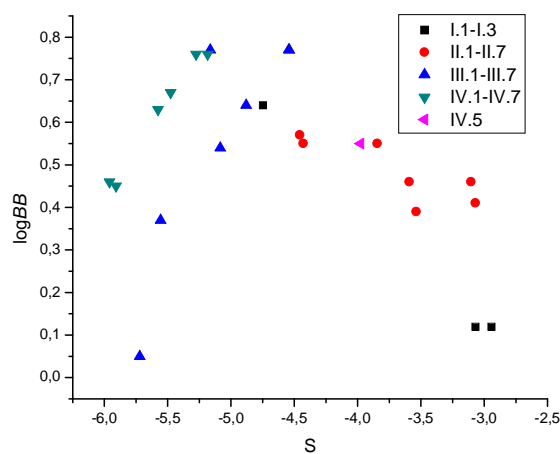
Tabela 4.9. Ispitivanje sklonosti stiril laktona moždanoj penetraciji prema „pravilima palca” (Clark, 2003)

Jed.	„Pravila palca”					Odstupanja
	MW<450	N+O<6	ClogP – (N+O)>0	TPSA<70	logD 1-3	
I.1	250,25	5	-4,981	75,99	0,81	3
I.2	250,25	5	-4,981	75,99	0,81	3
I.3	340,37	5	-3,825	64,99	2,92	1
II.1	276,24	6	-6,042	71,06	2,39	3
II.2	292,28	6	-6,265	63,22	1,92	2
II.3	262,26	5	-5,104	53,99	2,61	1
II.4	262,26	5	-5,104	53,99	2,61	1
II.5	332,30	7	-6,604	80,29	2,52	3
II.6	332,30	7	-6,604	80,29	2,52	3
II.7	350,29	7	-6,461	80,29	2,49	3
III.1	380,39	6	-3,660	82,06	2,99	3
III.2	410,42	7	-4,741	91,29	3,25	4
III.3	398,38	6	-3,752	82,06	3,14	4
III.4	410,42	7	-4,741	91,29	3,25	4
III.5	425,39	9	-6,917	130,89	3,05	4
III.6	364,39	5	-1,464	61,83	3,79	2
III.7	382,38	5	-1,321	61,83	4,15	2
IV.1	380,39	6	-3,581	82,06	3,45	4
IV.2	425,39	9	-6,838	130,89	3,27	4
IV.3	410,42	7	-4,662	91,29	3,56	4
IV.4	398,38	6	-3,438	82,06	3,32	4
IV.5	510,53	7	-1,665	88,13	5,62	5
IV.6	425,39	9	-6,838	130,89	3,27	4
IV.7	410,42	7	-4,662	91,29	3,56	4

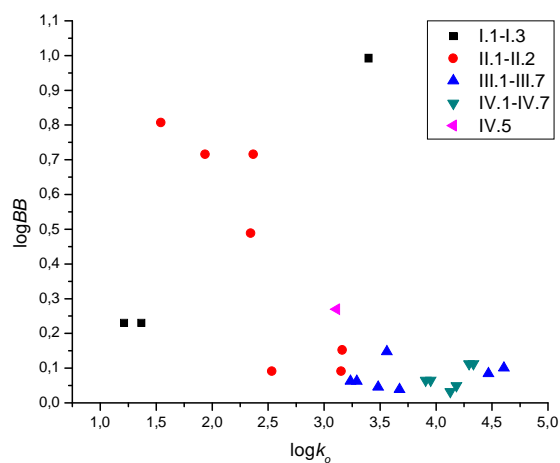
MW – molekulska masa; N+O – zbir atoma azota i kiseonika; ClogP – parametar lipofilnosti; TPSA – ukupna polarna površina; logD – parametar lipofilnosti; Odstupanja – podebljani brojevi



Slika 4.30. Zavisnost između retencione konstante  $\log k_o$  i prediktora krvno-moždane barijere,  $\log BB$  (I-Lab 2.0)

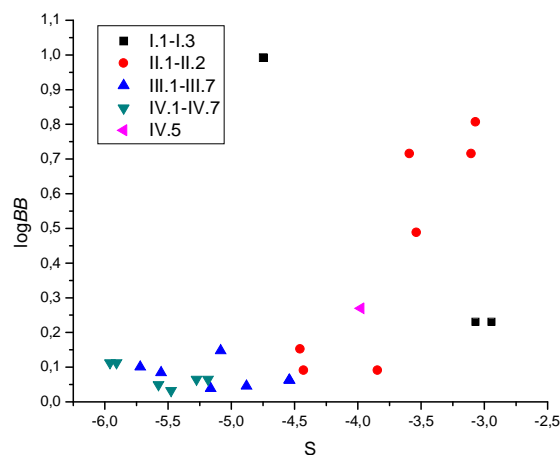


Slika 4.31. Zavisnost između retencione konstante  $S$  i prediktora krvno-moždane barijere,  $\log BB$  (I-Lab 2.0)



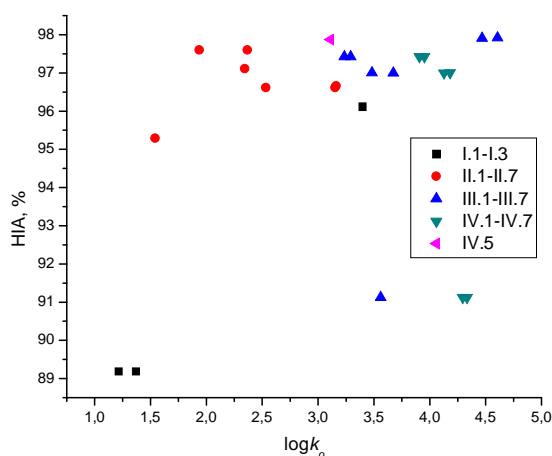
Slika 4.32. Zavisnost između retencione konstante  $\log k_o$  i prediktora krvno-moždane barijere,  $\log BB$  (PreADMET)



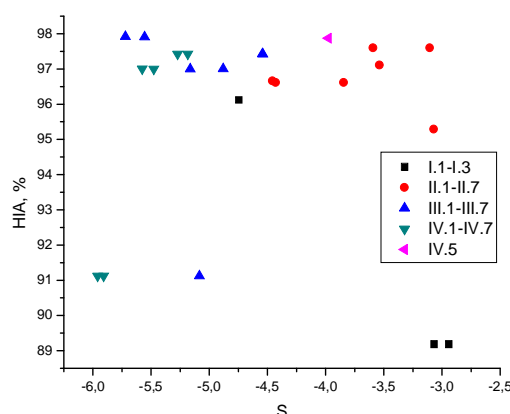


Slika 4.33. Zavisnost između retencione konstante  $S$  i prediktora *krvno-moždane barijere*,  $\log BB$  (PreADMET)

Procenat humane intestinalne apsorpcije ( $\%HIA$ ) definiše se kao procenat oralno unetog farmaceutika koji stiže u jetru. Većina stiril laktone apsorbuje se u količinama iznad 95%. Manje se apsorbuju ( $89\% < HIA < 92\%$ ) samo osnovni molekuli (+)-goniofufuron (**I.1**), 7-*epi*-(+)-goniofufuron (**I.2**), 7-*epi* nitro derivat krasalaktona B (**III.5**) i nitro stereoizomeri krasalaktona C (**IV.2**, **IV.6**), (Prilog, *Tabela P-7.4*). Otuda su pri upoređivanju hromatografskih lipofilnih parametara  $\log k_o$  i  $S$  sa  $HIA$  molekuli grupisani u dva skupa – skup sa vrednostima  $HIA$  ispod 92% i skup sa vrednostima  $HIA$  iznad 95% (Slike 4.34 i 4.35).



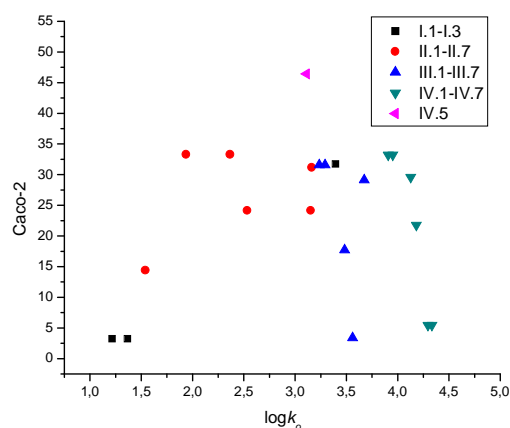
Slika 4.34. Zavisnost između retencione konstante  $\log k_o$  i prediktora *humane intestinalne apsorpcije*,  $HIA$



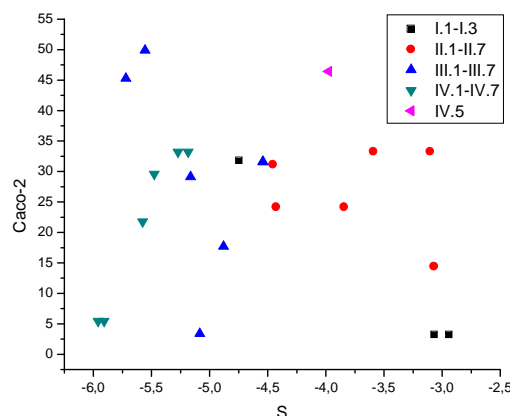
Slika 4.35. Zavisnost između retencione konstante  $S$  i prediktora *humane intestinalne apsorpcije*,  $HIA$

Za antikonvulzante, derivate sucinimida Perišić-Janjić i sar. (2011) utvrdili su da je zavisnost između  $\log k_o$  i  $HIA$  parabolična.

Ispitivani stiril laktoni imaju umerenu/srednju biološku aktivnost ( $4 \text{ nm/sec} < \text{Caco-2} < 70 \text{ nm/sec}$ ) u odnosu na propustljivost ćelija adenocarcinoma debelog creva. Nisku propustljivost odnosno apsorpciju ( $\text{Caco-2} < 4 \text{ nm/sec}$ ) imaju prirodni molekuli (+)-goniofufuron (**I.1**) i 7-*epi*-(+)-goniofufuron (**I.2**) i 7-*epi* nitro derivat krasalaktone B (**III.5**). Nitro stereoizomeri krasalaktone C (**IV.2**, **IV.6**), koji su imali malu intestinalnu apsorpciju, iako se svrstavaju u kategoriju jedinjenja sa srednjom propustljivošću ( $\text{Caco-2}=5,435$ ), njihova propustljivost je oko tri do devet puta manja od jedinjenja iz ove kategorije. Trioksiepan, **II.2** ima izuzetno visoku vrednost parametra  $\text{Caco-2}$  (6327,190), (Prilog, Tabela P-7.4). Definisane korelacije hromatografskih konstanti  $\log k_o$  i  $S$  sa  $\text{Caco-2}$  parametrom nisu dobijene (Slike 4.36 i 4.37).



Slika 4.36. Zavisnost između retencione konstante  $\log k_o$  i prediktora *oralne intestinalne apsorpcije*,  $\text{Caco-2}$



Slika 4.37. Zavisnost između retencione konstante  $S$  i prediktora *oralne intestinalne* apsorpcije, *Caco-2*

#### 4.3.2. Korelacije *in silico* farmakokinetičkih parametara sa drugim molekulskim deskriptorima

U delu rada 4.2.1 pokazano je kako parametri lipofilnosti određeni hromatografski,  $\log k_o$  i  $S$  utiču na farmakokinetičke parametre stiril laktona. Da bi se utvrdio uticaj i drugih faktora/molekulskih deskriptora na farmakokinetičke parametre molekula, ispitivani su linearni (LR) i višestruki linearni regresioni modeli (MLR) za sve molekule osim dicinamata **IV.5**. Izbor *in silico* parametara za MLR iz Tabele 4.8, deskriptora lipofilnosti, ADMET i bioaktivnih deskriptora (Prilog, Tabele P-7.3 – P-7.5) te topoloških i geometrijskih deskriptora (Prilog, Tabela P-7.6) izveden je postupkom stepenaste selekcije, SS (eng. *Step Selection*) NCSS 2007 programom (Hintze). U Tabelama P-7.3 – P-7.6 prikazani su samo oni deskriptori koji su ušli u regresije. Maksimalan broj deskriptora u modelima je tri, kako bi se izbegla tzv. pre-parametarizacija. Najbolje korelacije prikazane su jednačinama 4.15 – 4.29 i Slikama 4.38 – 4.42, a statistički parametri validacije MLR regresija tabelarno (Tabele 4.10 i 4.11).

Konstanta apsorpcije,  $k_a$

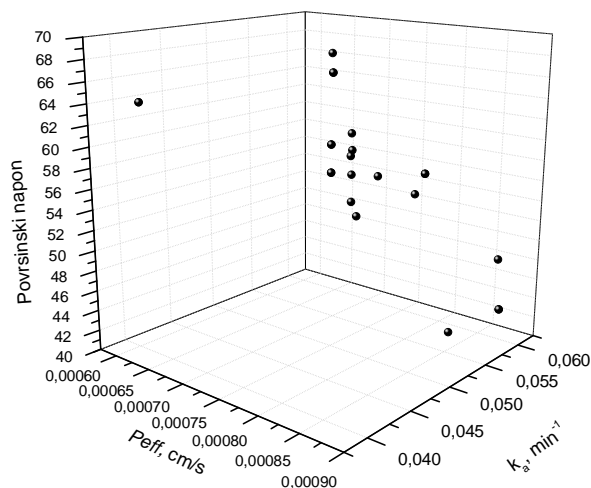
$$k_a = 68,4638(\pm 0,8111) P_{eff} + 1,47 \cdot 10^{-4}(\pm 6,23 \cdot 10^{-4}) \quad (4.15)$$

$$R_{adj}^2 = 0,9963; F = 7125,0777; p = 0,000000$$

$$k_a = 70,2860(\pm 1,1240) P_{eff} + 2,31 \cdot 10^{-5}(\pm 1,06 \cdot 10^{-5}) PN^1 - 2,56 \cdot 10^{-3}(\pm 1,37 \cdot 10^{-3}) \quad (4.16)$$

$$k_a = 1,07 \cdot 10^{-3}(\pm 5,52 \cdot 10^{-4}) ACD\log P^2 - 6,84 \cdot 10^{-4}(\pm 8,10 \cdot 10^{-5}) PN^1 + 1,96 \cdot 10^{-3}(\pm 4,60 \cdot 10^{-4}) HBA^3 - 7,68 \cdot 10^{-2}(\pm 3,90 \cdot 10^{-3}) \quad (4.17)$$

<sup>1</sup> $PN$  – površinski napon; <sup>2</sup> $ACD\log P$  – parametar lipofilnosti; <sup>3</sup> $HBA$  – broj akceptorskih vodoničnih veza



Slika 4.38. Višestruki linearni regresioni model  $k_a$  sa  $P_{eff}$  i površinskim naponom (jednačina 4.16)

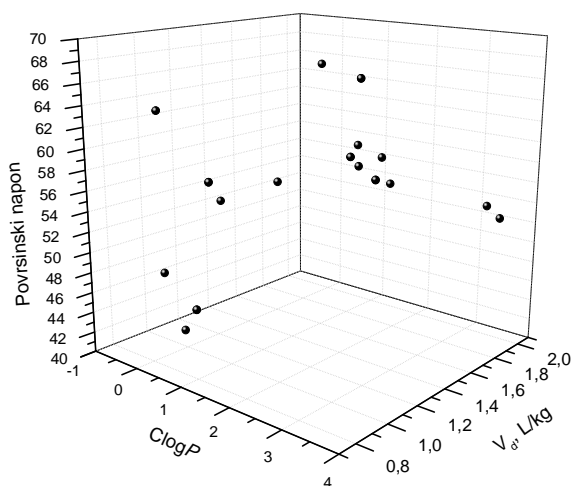
Zapremina distribucije,  $V_d$

$$V_d = 0,2523(\pm 0,0119) \text{Clog}P^4 - 0,0114(\pm 0,0020) PN^1 + 1,5745(\pm 0,1092) \quad (4.18)$$

$$V_d = 0,1997(\pm 0,0192) \text{Clog}P^4 - 0,0125(\pm 0,0017) PN^1 - 0,0797(\pm 0,0250) S^5 + 1,3514(\pm 0,1142) \quad (4.19)$$

$$V_d = 0,2527(\pm 0,0122) \text{Clog}P^4 - 0,0121(\pm 0,0030) PN^1 - 1,3070(\pm 4,2541) k_a + 1,6794(\pm 0,3591) \quad (4.20)$$

<sup>1</sup>PN – površinski napon; <sup>4</sup>ClogP – parametar lipofilnosti; <sup>5</sup>S – hromatografski parametar lipofilnosti



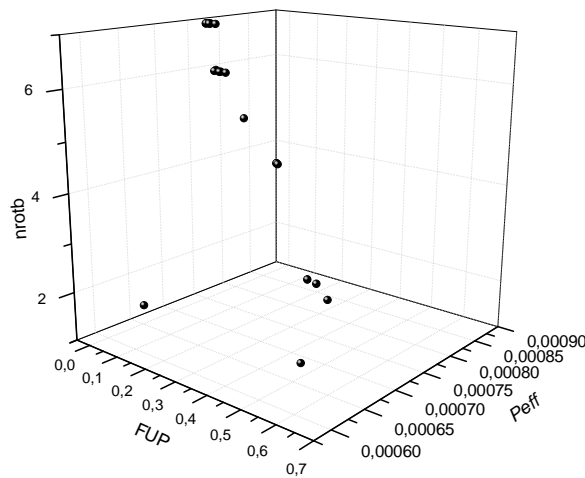
Slika 4.39. Višestruki linearni regresioni model  $V_d$  sa  $\text{Clog}P$  i površinskim naponom (jednačina 4.18)

Efektivna permeabilnost u jejunumu,  $Pe_{eff}$

$$Pe_{eff} = -5,01 \cdot 10^{-4} (\pm 2,30 \cdot 10^{-6}) FUP - 3,13 \cdot 10^{-5} (\pm 1,63 \cdot 10^{-6}) nrotb^6 + 9,80 \cdot 10^{-4} (\pm 1,03 \cdot 10^{-5}) \quad (4.21)$$

$$Pe_{eff} = -5,42 \cdot 10^{-4} (\pm 3,77 \cdot 10^{-5}) FUP - 3,56 \cdot 10^{-5} (\pm 3,51 \cdot 10^{-6}) nrotb^5 + 1,19 \cdot 10^{-6} (\pm 8,75 \cdot 10^{-7}) PN^1 + 9,38 \cdot 10^{-4} (\pm 3,24 \cdot 10^{-5}) \quad (4.22)$$

<sup>1</sup> $PN$  – površinski napon; <sup>6</sup> $nrotb$  – broj rotabilnih veza



Slika 4.40. Višestruki linearni regresioni model  $Pe_{eff}$  sa  $FUP$  i  $nrotb$  (jednačina 4.21)

Frakcija jedinjenja nevezana za protein u plazmi,  $FUP$

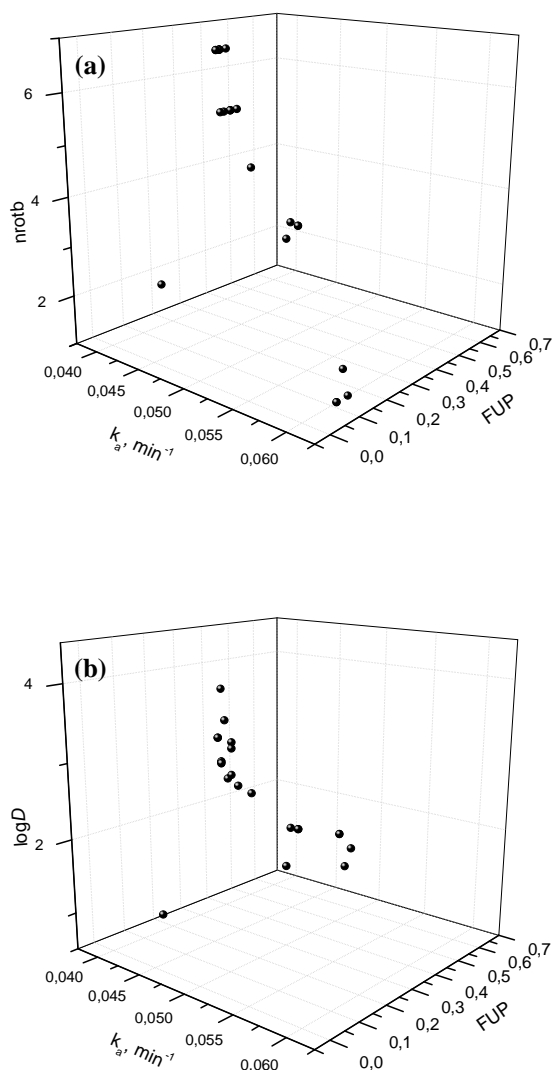
$$FUP = -27,7053 (\pm 1,5313) k_a - 0,0606 (\pm 0,0027) nrotb^6 + 1,8753 (\pm 0,0751) \quad (4.23)$$

$$FUP = -10,3394 (\pm 1,7683) k_a - 0,1681 (\pm 0,0103) \log D^7 + 1,1532 (\pm 0,0890) \quad (4.24)$$

$$FUP = -20,5100 (\pm 1,1308) k_a - 0,0368 (\pm 0,0033) nrotb^6 - 0,0734 (\pm 0,0094) \log D^7 + 1,5935 (\pm 0,0518) \quad (4.25)$$

$$FUP = -30,3039 (\pm 0,8571) k_a - 0,0740 (\pm 0,0026) nrotb^6 + 0,0156 (\pm 0,0024) natoms_{ali}^8 + 1,8226 (\pm 0,0436) \quad (4.26)$$

<sup>6</sup> $nrotb$  – broj rotabilnih veza; <sup>7</sup> $\log D$  – parametar lipofilnosti; <sup>8</sup> $natoms_{ali}$  – broj alifatičnih C atoma



Slika 4.41. Višestruki linearni regresioni modeli  $FUP$  sa: (a)  $k_a$  i  $nrotb$  (jednačina 4.23) i (b)  $k_a$  i  $\log D$  (jednačina 4.24)

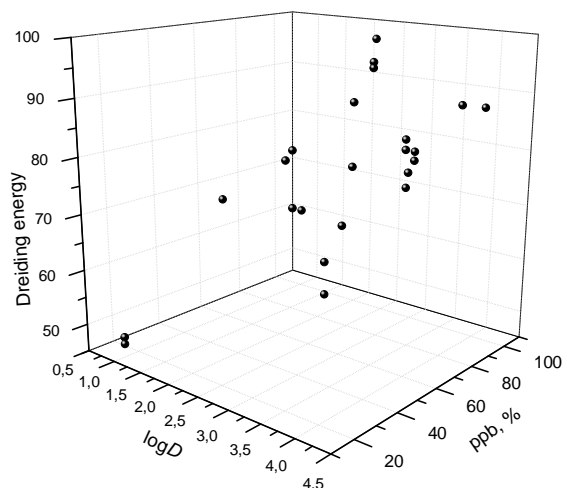
Vezivanje protein-plazma,  $PPB$

$$PPB = 27,4582(\pm 2,2435) \log D^7 - 0,2550(\pm 0,1285) DE^9 + 6,2829(\pm 6,7141) \quad (4.27)$$

$$PPB = 30,0488(\pm 2,9423) \log D^7 - 0,0590(\pm 0,0344) MF94^{10} - 7,3697(\pm 2,7205) ACD\log P^2 - 13,3006(\pm 5,3284) \quad (4.28)$$

<sup>7</sup> $\log D$  – parametar lipofilnosti; <sup>9</sup> $DE$  – Dreiding-ova energija; <sup>10</sup> $MF94$  – MMFF94 energija;

<sup>2</sup> $ACD\log P$  – parametar lipofilnosti



Slika 4.42. Višestruki linearni regresioni model *PPB* sa *logD* i Dreiding-ovom energijom (jednačina 4.27)

Krvno-moždana barijera, *logBB*:

$$\log BB = -2,3784(\pm 0,2825) FUP - 0,0120(\pm 0,0002) PPB + 0,1504(\pm 0,0354) HBD^{11} + 1,4915(\pm 0,1667) \quad (4.29)$$

<sup>11</sup>*HBD* – broj donorskih vodoničnih veza

Iz jednačina 4.15 – 4.29 se vidi da različiti molekularni deskriptori utiču na farmakokinetičke osobine stiril laktone. Lipofilnost molekula (*ACDlogP*, *ClogP*, *logD*, *S*) najviše utiče na *k<sub>a</sub>*, *V<sub>d</sub>*, *FUP*, *PPB* (jednačine 4.17 – 4.20, 4.24, 4.25, 4.28) što je u skladu sa literaturnim podacima (Mayer i van der Waterbeemd, 1985; Colmenarejo i sar., 2001; Ghafourian i Amin, 2013; Perišić-Janjić i sar., 2013; Milošević i sar., 2013; 2014a; 2014b). Površinski napon (*PN*), ima uticaja na apsorpciju (jednačina 4.16), zapreminu distribucije (jednačine 4.18 – 4.20) i permeabilnost (jednačina 4.22). Broj rotabilnih veza (*nrotb*) značajan je za permeabilnost i slobodnu (nevezanu) frakciju jedinjenja (jednačine 4.21 – 4.26). Broj akceptorskih vodoničnih veza (*HBA*) utiče na apsorpciju (jednačina 4.17), broj donorskih vodoničnih veza (*HBD*) na moždanu penetraciju (jednačina 4.29) a broj alifatičnih C atoma u molekulu (*natoms<sub>ali</sub>*) na slobodnu frakciju jedinjenja (jednačina 4.26). Geometrijski deskriptori *Dreiding-ova energija* i *MMFF94 energija* značajni su za vezivanje molekula za proteine plazme (jednačine 4.27 i 4.28).

Tabela 4.10. Statistički parametri za MLR korelacije prikazane jednačinama 4.16 – 4.22

Statistički parametar	Broj jednačine						
	4.16	4.17	4.18	4.19	4.20	4.21	4.22
<b>R</b>	0,9988	0,8920	0,9791	0,9964	0,9792	0,9817	0,9833
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9976	0,7957	0,9587	0,9731	0,9589	0,9637	0,9699
<b>R<sup>2</sup><sub>adj</sub></b>	0,9974	0,7636	0,9545	0,9689	0,9524	0,9600	0,9616
<b>F</b>	4195,04	24,67	231,91	229,21	147,64	265,17	184,83
<b>p</b>	0,000000	0,000001	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
<b>RMSE</b>	$2,44 \cdot 10^{-4}$	0,0023	0,0633	0,0052	0,0648	$1,39 \cdot 10^{-5}$	$1,36 \cdot 10^{-5}$
<b>VIF</b>	$2,26_{Peff}$	$1,04_{ACDlogP}^2$	$1,21_{ClogP}^4$	$4,60_{ClogP}^4$	$1,22_{ClogP}^4$	$1,61_{nroth}^5$	$4,54_{FUP}$
	2,2	$1,45_{PN}^1$	$1,21_{PN}^1$	$1,26_{PN}^1$	$2,47_{PN}^1$	$1,61_{FUP}$	$7,84_{nroth}^5$
	$6_{PN}^1$	$1,47_{HBA}^3$		$4,81_S$	$2,16_{ka}$		$4,90_{PN}^1$
<b>R<sup>2</sup><sub>cv</sub></b>	0,9971	0,6530	0,9465	0,9553	0,9426	0,9525	0,9461
<b>PRESS</b>	$1,46 \cdot 10^{-6}$	$1,74 \cdot 10^{-4}$	0,1036	0,0866	0,1113	$5,07 \cdot 10^{-9}$	$5,76 \cdot 10^{-9}$
<b>TSS</b>	$5,02 \cdot 10^{-4}$	$5,02 \cdot 10^{-4}$	1,9380	1,9384	1,9380	$1,07 \cdot 10^{-7}$	$1,07 \cdot 10^{-7}$
<b>PRESS/TSS</b>	0,0029	0,3466	0,0534	0,0447	0,0574	0,0473	0,0538

<sup>1</sup>PN – površinski napon; <sup>2</sup>ACDlogP – parametar lipofilnosti; <sup>4</sup>ClogP – parametar lipofilnosti; <sup>3</sup>HBA – broj akceptorskih vodoničnih veza; <sup>5</sup>nroth – broj rotabilnih veza; FUP – frakcija nevezana za proteine

Tabela 4.11. Statistički parametri za MRL korelacije prikazane jednačinama 4.23 – 4.29

Statistički parametar	Broj jednačine						
	4.23	4.24	4.25	4.26	4.27	4.28	4.29
<b>R</b>	0,9862	0,9755	0,9967	0,9957	0,9642	0,9706	0,9001
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9726	0,9516	0,9935	0,9915	0,9296	0,9420	0,8102
<b>R<sup>2</sup><sub>adj</sub></b>	0,9698	0,9468	0,9925	0,9902	0,9226	0,9328	0,7802
<b>F</b>	354,61	196,78	974,23	741,71	132,11	102,82	27,0323
<b>p</b>	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
<b>RMSE</b>	0,0285	0,0378	0,0142	0,0162	5,7636	5,3715	0,0989
<b>VIF</b>	$1,10_{ka}$	$1,10_{ka}$	$3,19_{ka}$	$1,40_{ka}$	$2,25_{logD}$	$4,45_{logD}$	$4,82_{FUP}$
	$1,10_{nroth}^5$	$1,10_{logD}^6$	$6,46_{nroth}^5$	$2,98_{nroth}^5$	$2,25_{DE}^8$	$1,35_{MF94}^9$	$4,29_{PPB}$
			$6,46_{logD}^6$	$2,74_{nat\_ali}^7$		$4,70_{ACDlogP}^2$	$1,27_{HBD}^{10}$
<b>R<sup>2</sup><sub>cv</sub></b>	0,9665	0,9314	0,9904	0,9875	0,9079	0,9210	0,6845
<b>PRESS</b>	0,0198	0,0405	0,0056	0,0074	870,41	746,4551	0,3088
<b>TSS</b>	0,5911	0,5911	0,5911	0,5911	9447,88	9447,8850	0,9888
<b>PRESS/TSS</b>	0,0335	0,0685	0,0095	0,0125	0,0921	0,0790	0,3123

<sup>2</sup>ACDlogP – parametar lipofilnosti; <sup>5</sup>nroth – broj rotabilnih veza; <sup>6</sup>logD – parametar lipofilnosti; <sup>7</sup>natoms<sub>ali</sub> – broj alifatičnih atoma; <sup>8</sup>DE – Dreiding-ova energija; <sup>9</sup>MF94 – MMFF94 energija; <sup>10</sup>HBD – broj donorskih vodoničnih veza. Nazivi statističkih parametara dati su u poglavlju 3.4.5.



Postoji i međusobna zavisnost farmakokinetičkih parametara:  $k_a$  od  $Pe_{ff}$  (jednačina 4.15),  $Pe_{ff}$  od  $FUP$  (jednačine 4.21, 4.22),  $FUP$  od  $k_a$  (jednačine 4.23 - 4.26),  $\log BB$  od  $PPB$  i  $FUP$  (jednačina 4.29).

Rezultati iz *Tabela 4.10* i *4.11* ukazuju na dobru statističku značajnost navedenih MLR regresija. Najmanja značajnost ( $R^2_{adj} \sim 0,9$ ) je za korelacije  $k_a$ ,  $\log BB$  i molekulskih deskriptora (jednačine 4.17 i 4.29, redom).

#### 4.3.3. Korelacija *in silico* farmakoloških receptora i retencione konstante lipofilnosti $\log k_o$

Farmaceutici, posebno oni koji se koriste u dužem vremenskom periodu, trebalo bi da nemaju ili da imaju sasvim neznatne negativne efekte. Zbog toga se očekuje da se potencijalni farmaceutici u značajnoj meri ne vezuju za irelevantne farmakološke receptore ili enzime, npr. G protein spregnuti receptori (GPCR), modulatori jonskog kanala (ICM), nuklearni receptori (NRL), inhibitori kinaze (KI), proteaze (PI) i enzima (EI).

Farmakološki receptori izračunati su *in silico* programom *Molinspiration* (<http://www.molinspiration.com>)

G protein spregnuti receptori (GPCR) reaguju na molekule izvan ćelije i aktiviraju unutrašnje puteve prenosa signala, a krajnji rezultat je odgovor ćelije. Većina analiziranih stiril laktona ima nisku aktivnost prema GPCR ligandima ( $GPCR < 0,2$ ). Ostali molekuli su umereno aktivni i GPCR iznosi 0,21 – 0,23 (Prilog, *Tabela P-7.5*).

Modulator jonskog kanala (ICM) je jedinjenje koje je blokator kanala ili otvara kanal. Iz *Tabele P-7.5* u Prilogu vidi se da svi molekuli imaju veoma nisku ICM aktivnost ( $-0,14 - 0,09$ ).

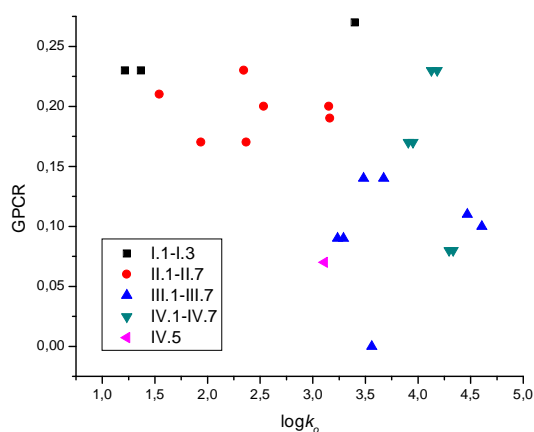
Nuklearni receptori konvergiraju različite intra- i ekstracelularne signale u regulaciji genetskih programa. Prediktor sposobnosti građenja liganda sa nuklearnim receptorom, NRL ima vrednosti ispod 0,2 što ukazuje na nisku aktivnost ispitivanih stiril laktona. Nešto malo aktivniji su samo krasalakton B (**III.1**) i njegov fluoro derivat **III.3**, čije su NRL vrednosti 0,22 i 0,23, redom (Prilog, *Tabela P-7.5*).

Inhibitor kinaze (KI) je onaj molekul koji blokira delovanje jedne ili više protein kinaza, enzima koji su odgovorni za fosforilovanje proteina i mogu varirati njegovu funkciju. U pogledu ove osobine aktivnost stiril laktona je veoma niska (KI od  $-0,1$  do  $0,11$ ) (Prilog, *Tabela P-7.5*).

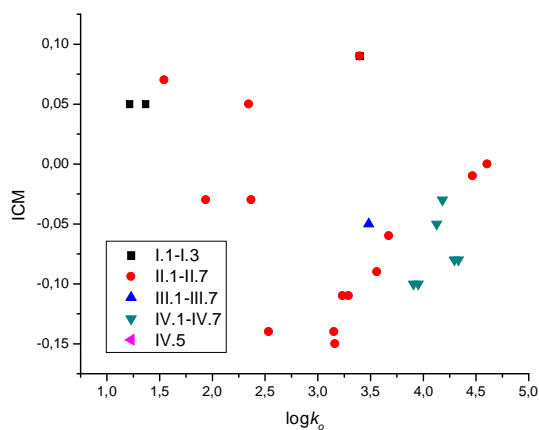
Inhibitori proteaze (PI) sprečavaju virusnu replikaciju selektivnim vezivanjem za virusne proteaze i blokiraju proteolitičko cepanje prekursora proteina koji su neophodni za produkciju infektivnih virusnih čestica. Umerenu aktivnost inhibicije proteaze imaju samo benzil derivat 7-*epi*-(+)-goniofufurona (**I.3**), trioksiepan (**II.1**) i triciklični cinamatni derivati **II.5 – II.7**, dok ostali molekuli pokazuju slabu aktivnost (Prilog, *Tabela P–7.5*).

Inhibitor enzima (EI) je molekul koji se vezuje za enzim i smanjuje njegovu aktivnost. Vrednosti EI su u rasponu 0,28 – 0,69. To znači da ima stiril laktone sa srednjom (EI 0,2 – 0,5) i visokom (EI > 0,5) biološkom aktivnošću. Visoku biološku aktivnost poseduju prirodni stiril laktoni **I.1** i **I.2**, kao i benzil derivat 7-*epi*-(+)-goniofufurona (molekul **I.3**) i triciklični derivat **II.1** (Prilog, *Tabela P–7.5*).

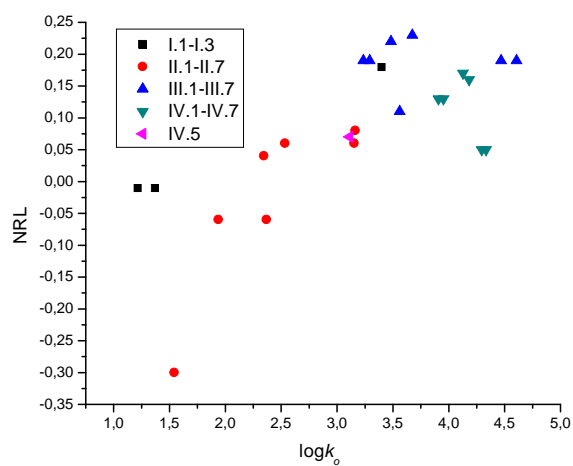
Zavisnosti između retencione konstante  $\log k_o$  i farmakoloških receptora date su na *Slikama 4.43 – 4.48*.



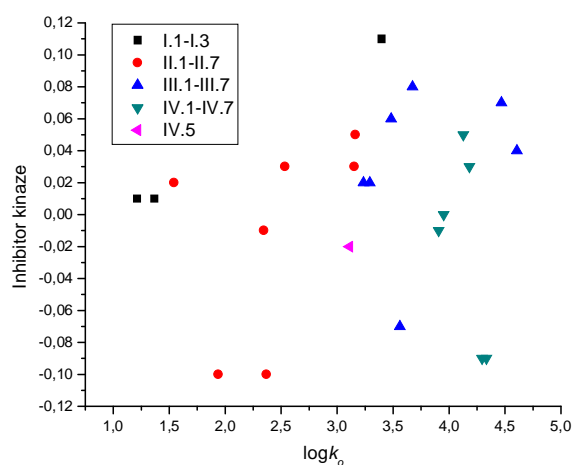
*Slika 4.43. Zavisnost između retencione konstante  $\log k_o$  i prediktora vezivanja za G-protein spregnuti receptor, GPCR*



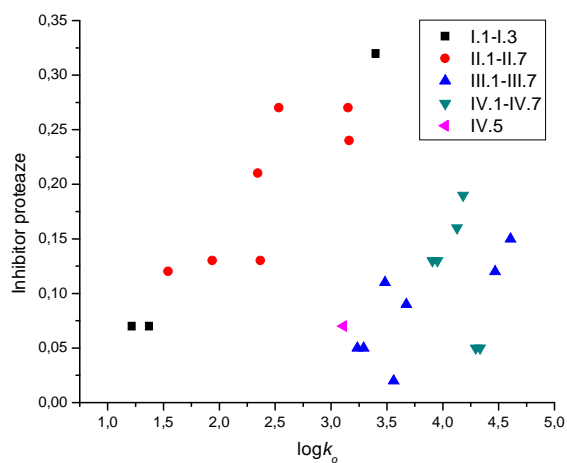
*Slika 4.44. Zavisnost između retencione konstante  $\log k_o$  i prediktora modulator jonskog kanala, ICM*



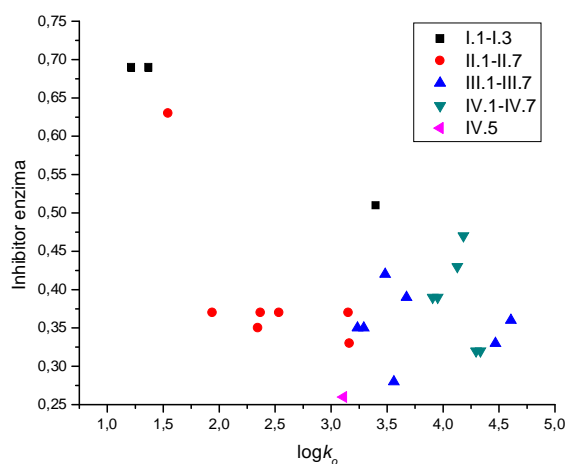
Slika 4.45. Zavisnost između retencione konstante  $\log k_o$  i prediktora vezivanja liganda za nuklearni receptor, NRL



Slika 4.46. Zavisnost između retencione konstante  $\log k_o$  i prediktora inhibitor kinaze



Slika 4.47. Zavisnost između retencione konstante  $\log k_o$  i prediktora inhibitor proteaze



Slika 4.48. Zavisnost između retencione konstante  $\log k_o$  i prediktora *inhibitora enzima*

U korelaciji hromatografskog lipofilnog parametra  $\log k_o$  i *in silico* farmakoloških receptora (bioaktivni deskriptori) stiril laktone GPCR liganada, modulatora jonskog kanala (ICM), nuklearnih receptora (NRL), inhibitora kinaze (KI), proteaze (PI) i enzima (EI) nisu dobijene značajne korelacije (Slike 4.43 – 4.48). Jedino su u slučaju korelacije  $\log k_o$  i parametra *PI* jedinjenja grupisana u zavisnosti od lipofilnosti jedinjenja. Jedan skup čine jedinjenja **I** i **II** grupe (osnovni molekuli **I.1**, **I.2**, derivat **I.3** i triciklični derivati **II.1** – **II.7**), a drugi skup molekuli **III** i **IV** grupe odnosno krasalaktone B i C i njihovi derivati (Slika 4.47).

#### 4.4. Biološka evaluacija i SAR analiza ispitivanih stiril laktone

Da bi se utvrdio biološki značaj novostetizovanih jedinjenja ispituje se efikasnost inhibicije proliferacije tumorskih ćelija, koja se kvantitativno izražava inhibicionom koncentracijom,  $IC_{50}$ , odnosno kao koncentracija ispitivane supstance pri kojoj se broj tretiranih ćelija smanjuje za 50% u poređenju sa netretiranom kontrolom. Opšte prihvaćeni kriterijumi za ocenu antiproliferativne aktivnosti jedinjenja su sledeći:

- $IC_{50} < 20 \mu M$  – zadovoljavajuća citotoksičnost jedinjenja;
- $IC_{50}$  u intervalu 20 – 100  $\mu M$  – umerena ili slaba citotoksičnost jedinjenja;
- $IC_{50} > 100 \mu M$  – jedinjenja se smatraju netoksičnim.

U Tabeli 2.2 prikazana je do sada utvrđena *in vitro* citotoksičnost ispitivanih stiril laktone na više humanih malignih ćelija (Benedeković i sar., 2014a; 2014b). U ovom radu ispitan je uticaj istih jedinjenja na rast četiri nove humane maligne ćelije: kancer prostate (PC3), kancer debelog creva (HT-29), melanom (Hs294T), adenokarcinom pluća (A549). Da

bi se utvrdilo da li jedinjenja pokazuju selektivnu citotoksičnost prema tumorskim ćelijskim linijama, ispitana je njihova antiproliferativna aktivnost i prema normalnim ćelijama fetalnih fibroplasta pluća (MRC-5). Kao pozitivna kontrola korišćen je komercijalni antitumorski agens doksorubicin (DOX). Rezultati ovih analiza prikazani su u *Tabeli 4.12*.

*Tabela 4.12. In vitro citotoksičnost ispitivanih prirodnih i novosintetisanih stiril laktona na nove ćelijske linije kancera, zdrave ćelije fetalnih fibroplasta pluća i DOX*

Jed.	IC <sub>50</sub> (μM)				
	Ćelijske linije				
	PC3	HT-29	Hs294T	A549	MRC-5
<b>I.1</b>	254,36	0,59	4665,49	35,21	>100
<b>I.2</b>	899,69	1,34	43,58	21,02	>100
<b>I.3</b>	487,66	56,25	241,31	32,25	>100
<b>II.1</b>	185,35	274,33	4682,25	32,04	>100
<b>II.2</b>	537,78	98,25	45,32	102,32	>100
<b>II.3</b>	334,98	89,02	35,64	108,56	>100
<b>II.4</b>	861,37	381,25	3159,46	28,56	>100
<b>II.5</b>	149,03	25,63	364,58	912,21	>100
<b>II.6</b>	15,64	2,51	2,53	164,64	>100
<b>II.7</b>	12,31	729,31	<b>0,0021</b>	101,56	>100
<b>III.1</b>	25,11	2893,54	138,55	4,36	>100
<b>III.2</b>	193,43	453,31	1231,21	25,36	>100
<b>III.3</b>	101,21	305,55	976,36	36,56	>100
<b>III.4</b>	54,39	46,04	335,23	31,02	>100
<b>III.5</b>	24,35	33,48	215,88	29,63	>100
<b>III.6</b>	286,22	986,45	7932,40	21,02	>100
<b>III.7</b>	114,32	586,23	1035,66	11,64	>100
<b>IV.1</b>	31,08	2,48	4878,92	2,58	>100
<b>IV.2</b>	191,51	58,08	102,32	29,55	>100
<b>IV.3</b>	702,22	98,78	5321,31	12,45	>100
<b>IV.4</b>	131,21	402,32	922,02	21,31	>100
<b>IV.5</b>	401,21	4,64	33,54	15,22	48,64
<b>IV.6</b>	101,32	385,41	151,32	11,08	>100
<b>IV.7</b>	105,41	273,40	167,42	9,64	>100
<b>DOX</b>	84,23	0,15	4,50	4,91	0,10

IC<sub>50</sub> – koncentracija jedinjenja koja inhibira rast 50% ćelija u poređenju sa netretiranom kontrolom; PC3 – kancer prostate; HT-29 – kancer debelog creva; Hs294T – melanom; A549 – adenokarcinom pluća; MRC-5 – normalne ćelije fetalnih fibroplasta pluća; DOX (doksorubicin) – komercijalni antitumorski agens

Prema  $IC_{50}$  vrednostima iz *Tabele 4.12* očigledno je da su ispitivana jedinjenja u potpunosti neaktivna prema normalnim MRC-5 ćelijama ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ) sa izuzetkom dicinamoaata **IV.5** koji je slabo toksičan ( $IC_{50} = 48,64 \mu M$ ) prema ovoj ćelijskoj liniji. Ovo jedinjenje ispoljava zadovoljavajuću citotoksičnost prema tumorskim ćelijama HT-29 i A549, a umereno je aktivan prema Hs294T ćelijskoj liniji. S obzirom na to da jedinjenje **IV.5** ne pokazuje selektivnu citotoksičnost i da se ne uklapa u pravila Lipinskog (Lipinski i sar., 2001) nije pogodno za oralnu administraciju. Komercijalni antitumorski agens doksorubicin pokazuje različitu antiproliferativnu aktivnost prema ispitivanim ćelijskim linijama i to slabu prema PC3, mikromolarnu prema HT-29 i zadovoljavajuću prema Hs294T i A549 ćelijskim linijama dok prema normalnim ćelijama fetalnih fibroblasta pluća (MRC-5) ima mikromolarnu aktivnost ( $IC_{50} = 0,10 \mu M$ ). Najaktivnije nosintetizovano jedinjenje je konformaciono kruti fluorocinamoil derivat **II.7** (u *Tabeli 4.12* naglašeno podebljanim brojem), koji ispoljava nanomolarnu aktivnost u Hs294T kulturi, daleko veću od aktivnosti DOX. Od DOX veću aktivnost imaju još sledeći nosintetizovani molekuli: **II.6**, **III.4** i **III.5** u PC3 kulturi, **II.6** u Hs294T kulturi. Aktivniji od DOX su i krasalaktone B (**III.1**) i C (**IV.1**) u PC3 i A549 kulturama. Ostali aktivni molekuli pokazuju umerenu do slabu citotoksičnost prema ispitivanim malignim ćelijama.

$IC_{50}$  – vrednosti (*Tabela 4.12*) ukazuju da je PC3 ćelijska linija osetljiva na prirodna jedinjenja krasalaktone B (**III.1**) i C (**IV.1**) i nosintetizovana jedinjenja **II.6**, **II.7**, **III.4** i **III.5**. Sva ova jedinjenja sadrže estarski vezanu cimetnu kiselinu. Triciklična jedinjenja **II.6** i **II.7** pokazuju zadovoljavajuće inhibitorne efekte ( $IC_{50} < 20 \mu M$ ) za razliku od odgovarajućih prirodnih proizvoda **I.1** i **I.2** koji su neaktivni prema ovoj ćeliji ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ). Molekuli **III.1**, **III.4**, **III.5** i **IV.1** su umereno ili slabo aktivni ( $20 \mu M < IC_{50} < 60 \mu M$ ). Međutim, svi aktivni molekuli prema PC3 ćelijama su ipak oko 1,5 (**III.4**) do 7 puta (**II.6**) aktivniji od DOX. Abirateron, koji se danas koristi u tretmanu kancera prostate (PC3), ima  $IC_{50}$  vrednost  $9,32 \mu M$  (Bruno i sar., 2008). Triciklični analog **II.7**, koji sadrži elektron-akceptorsku grupu F u *para* položaju cinamatnog aromatičnog prstena je 1,3 puta potentniji u poređenju sa molekulom **II.6** bez ove grupe. Uopšte, fluoro derivati (+)-goniofufurona i 7-*epi*-(+)-goniofufurona (Benedeković i sar., 2014a; 2014b) kao i hloro i bromo mimetici (+)-goniofufurona (Francuz i sar., 2012) u najvećem broju slučajeva pokazuju jaču citotoksičnost od osnovnih jedinjenja. Nasuprot ovome, uvođenjem takođe elektron-akceptorske grupe  $NO_2$  u isti položaj ne povećava se aktivnost molekula (uporediti **III.1** i **III.5**). Međutim, prisustvo elektron-donorske grupe  $OCH_3$  u tom položaju utiče na smanjenje citotoksične aktivnosti molekula oko dva puta (uporediti molekule **III.1** i **III.4**). Ako se posmatra uticaj apsolutne

stereochemije na C-7, očigledno je da je 7*R*-stereoizomer **II.7** potentniji od 7*S*-izomera **II.6**. Iste rezultate dobili su Benedeković i sar. (2014a) pri analizi njihove citotoksičnosti prema osam drugih tumorskih ćelijskih linija.

HT-29 ćelijska linija je najosetljivija na prirodne stiril laktone koji imaju mikromolarnu (**I.1**) i značajnu antitumorsku aktivnost (**I.2**, **IV.1**), ali su te aktivnosti približno 4 do 17 puta slabije u poređenju sa komercijalnim antitumorskim agensom DOX. Veoma sličan potencijal prirodnom stiril laktonu **IV.1** ima konformaciono kruti analog **II.6**. Ostali aktivni molekuli su novosintetizovani i umereno su (**II.5**, **III.5**) odnosno slabo su (**I.3**, **II.2**, **II.3**, **III.4**) citotoksični. Nitro derivat **III.5** aktivniji je za više od 10  $\mu\text{M}$  od metoksi derivata **III.4**. I na ovu ćelijsku liniju jače antitumorsko delovanje ispoljavaju 7*R*-stereoizomeri. Prirodni 7*R*-epimer **I.1** više od dva puta je aktivniji od 7*S*-epimera **I.2**, dok je kod konformaciono krutih analoga 7*S*-epimer **II.6** desetostruko aktivniji od 7*R*-epimera **II.5**.

Najveći potencijal u kulturi Hs294T ćelija zabeležen je nakon tretmana sa konformaciono krutim fluorocinamoil mimetikom (+)-goniofufurona, tj. jedinjenjem **II.7**, koje je istovremeno i najaktivnije sintetisano jedinjenje, što je već istaknuto. Naime, ovo jedinjenje pokazalo je nanomolarnu citotoksičnost ( $\text{IC}_{50}$  2,1 nM) koja je preko 2250 puta veća od DOX, dok je odgovarajući osnovni molekul **I.1** neaktivan. I molekul **II.6** je potentniji od DOX i to oko 2 puta, a od osnovnog molekula **I.2** čak 18 puta. Slabo antiproliferativno delovanje na ovu ćelijsku liniju poseduju molekuli **II.2** i **II.3**. Potpuno neaktivni su, pored molekula **I.1**, prirodni krasalaktoni B i C i njihovi derivati (**III.1** – **III.7**, **IV.1** – **IV.7**).

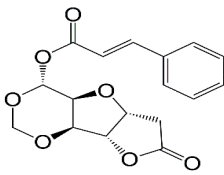
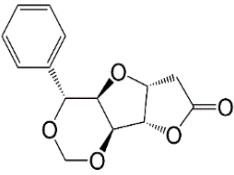
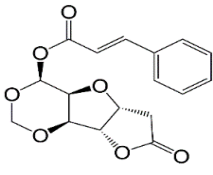
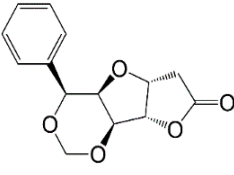
Najaktivniji molekuli u kulturi A549 ćelija su prirodni krasalaktoni B (**III.1**) i C (**IV.1**). Oni su potentniji oko 1,1 i 2 puta od DOX, redom. Prirodna jedinjenja **I.1** i **I.2** su umereno aktivna. Od 20 novosintetizovanih stiril laktona 15 pokazuje zadovoljavajuću do umerenu aktivnost prema A549 ćelijama. Većina konformaciono krutih analoga je neaktivna (**II.2**, **II.3**, **II.5** - **II.7**). Derivati krasalaktona C su potentniji od derivata krasalaktona B. Najaktivniji od njih su metoksi (**IV.7**) i nitro (**IV.6**) derivati 7-*S* serije. Uvođenje elektron-akceptorskih grupa  $\text{NO}_2$  ili F umesto elektron-donorske metoksi grupe  $\text{OCH}_3$  u *para* položaj cinamatnog aromatičnog prstena kod 7*R*-epimera krasalaktona C utiče na smanjenje inhibitorne aktivnosti molekula 1,7 i 2,4 puta odnosno za oko 6 i 17  $\mu\text{M}$  (uporediti molekule **IV.2** i **IV.3**, **IV.4** i **IV.3**). Od derivata krasalaktona B značajnu aktivnost ispoljila je deoksigenovana fluorocinamatna izostera **III.7**, koja je oko dva puta aktivnija od cinamatne izostere **III.6**. Fluorocinamoil derivat krasalaktona B 7*R*-konfiguracije ima za oko 10  $\mu\text{M}$  manju aktivnost od metoksi derivata iste konfiguracije (uporediti jedinjenja **III.2** i **III.3**), a 7*R*-epimer (**III.2**) je za oko 6  $\mu\text{M}$  citotoksičniji od 7*S*-epimera (**III.4**).

## Korelacije između strukture i antiproliferativne aktivnosti molekula

U cilju uspostavljanja korelacionih odnosa između strukture i antiproliferativne aktivnosti (SAR) sintetizovanih analoga i osnovnih molekula, citotoksičnost je kvantitativno izražena kao  $\Delta\log(IC_{50})$  odnosno kao razlika dekadnih logaritama od  $IC_{50}$  vrednosti analoga i kontrolnog molekula [ $\log(IC_{50})_{analog} - \log(IC_{50})_{kontrola}$ ]. Negativne  $\Delta\log(IC_{50})$  vrednosti ukazuju na snažniju antiproliferativnu aktivnost analoga u odnosu na kontrolni molekul. Kada su vrednosti  $\Delta\log(IC_{50})$  pozitivne, kontrolni molekul je aktivniji od analoga.

Pri upoređivanju uticaja uvođenja 7-*O*-cinamoil funkcije na antiproliferativnu aktivnost kao analozi posmatrani su triciklični molekuli iste apsolutne konfiguracije sa cinamoil funkcijom **II.5** i **II.6**, a kao kontrola molekuli sa fenil funkcijom **II.3** i **II.4** (Tabela 4.13).

Tabela 4.13. Korelacija između novo-uvodenih 7-*O*-cinamoil funkcija i antiproliferativne aktivnosti molekula

Upoređivana jedinjenja		$\Delta\log(IC_{50})$			
		Ćelijske linije			
Analog	Kontrola	PC3	HT-29	Hs294T	A549
 <b>II.5</b>	 <b>II.3</b>	na	-0,540	<b>II.3</b>	na
 <b>II.6</b>	 <b>II.4</b>	<b>II.6</b>	<b>II.6</b>	<b>II.6</b>	<b>II.4</b>

$IC_{50}$  – koncentracija jedinjenja koja inhibira rast 50% ćelija u poređenju sa netretiranom kontrolom; na – nije aktivan ni analog ni kontrolni molekul

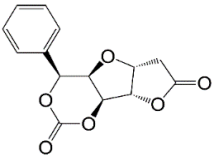
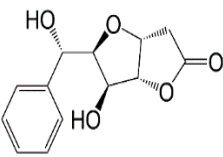
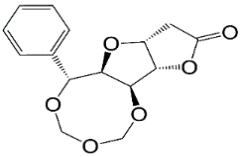
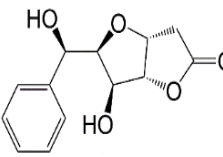
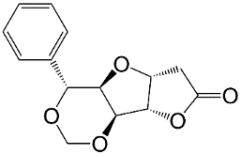
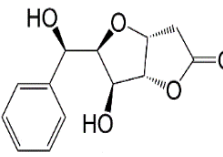
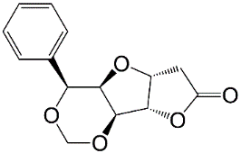
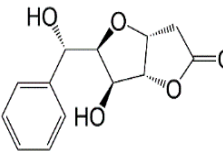
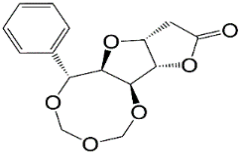
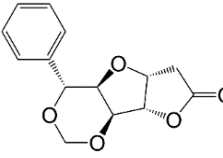
Na osnovu rezultata iz Tabele 4.13 može se zaključiti da triciklični molekul **II.6** sa 7-*O*-cinamoil funkcijom 7*S*-konfiguracije ispoljava aktivnost u PC3, HT-29 i Hs294T kulturama, a molekul **II.4** sa fenil funkcijom u kulturi A549. Međutim, molekul sa cinamoil funkcijom ali 7*R*-konfiguracije (**II.5**) značajno je aktivniji u HT-29 kulturi od kontrolnog molekula (**II.3**), dok prema PC3 i A549 ne pokazuje aktivnost kao ni kontrolni molekul.

U cilju ispitivanja uticaja novo-uvodenih 1,2-dioksan i 1,3,5-trioksaepan prstenova na antiproliferativnu aktivnost triciklični molekuli **II.1** – **II.4** posmatrani su kao analozi a



prirodna jedinjenja **I.1** i **I.2** kao kontrolni molekuli. Za zamenu 1,3,5-trioksaepan funkcije u molekulu **II.2** kontrolni molekul bio je **II.3** sa 1,2-dioksan prstenom. Rezultati ovih ispitivanja dati su u *Tabeli 4.14*.

*Tabela 4.14.* Korelacija između novo-uvadenih prstenova i antiproliferativne aktivnosti molekula

Upoređivana jedinjenja		$\Delta\log(IC_{50})$			
		Ćelijske linije			
Analog	Kontrola	PC3	HT-29	Hs249T	A549
 <b>II.1</b>	 <b>I.2</b>	na	<b>I.2</b>	<b>I.2</b>	0,183
 <b>II.2</b>	 <b>I.1</b>	na	2,221	<b>II.2</b>	<b>I.1</b>
 <b>II.3</b>	 <b>I.1</b>	na	2,178	<b>II.3</b>	<b>I.1</b>
 <b>II.4</b>	 <b>I.2</b>	na	<b>I.2</b>	<b>I.2</b>	0,133
 <b>II.2</b>	 <b>II.3</b>	na	0,043	0,104	na

$IC_{50}$  – koncentracija jedinjenja koja inhibira rast 50% ćelija u poređenju sa netretiranom kontrolom; na – nije aktivan ni analog ni kontrolni molekul

Kako pokazuju rezultati u *Tabeli 4.14* uvođenje prstena u molekul prirodnih proizvoda **I.1** i **I.2** uglavnom ne povećava njihovu antiproliferativnu aktivnost. Sintetisani molekuli **II.1** - **II.4** neaktivni kao i osnovni molekuli u kulturi PC3. Prema kulturama HT-29 i Hs294T nisu

aktivni molekuli **II.1** i **II.4**, a prema kulturi A549 molekuli **II.2** i **II.3**. Osnovni molekul **I.1** aktivniji je od **II.2** i **II.3** u kulturi HT-29, a molekul **I.2** aktivniji je od **II.1** i **II.4** u kulturi A549. Samo prema Hs294T ćelijskoj liniji triciklični molekuli **II.2** i **II.3** pokazuju slabu citotoksičnost za razliku od osnovnog molekula **I.1** koji je u ovoj kulturi neaktivan. Molekul sa 1,3,5-trioksaepanskim prstenom **II.2** je nešto aktivniji od molekula sa 1,3-dioksanskim prstenom **II.3** prema kulturama HT-29 i Hs294T, mada to nema praktičan značaj jer su ti molekuli u suštini slabo aktivni (*Tabela 4.12*).

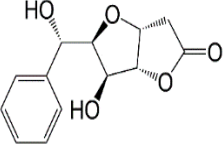
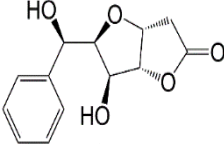
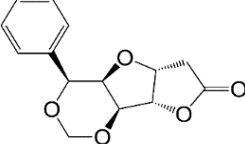
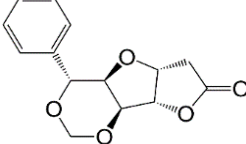
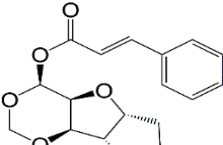
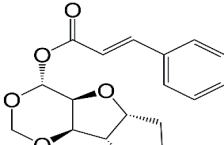
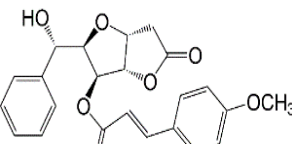
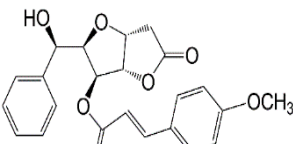
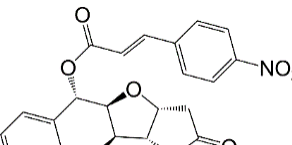
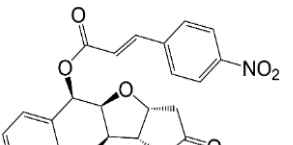
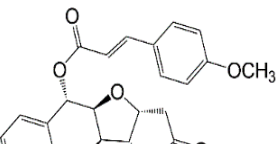
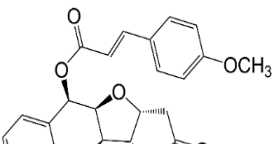
Od ispitivanih jedinjenja stereo izomeri su prirodni molekuli **I.1** i **I.2**, a od novosintetizovanih molekuli **II.3** i **II.4**, **II.5** i **II.6**, **III.2** i **III.4**, **IV.2** i **IV.6**, **IV.3** i **IV.7**. Da bi se utvrdio uticaj apsolutne konfiguracije na C-7 na antiproliferativnu aktivnost na pojedine tumorske ćelije, upoređivane su aktivnosti molekula 7*S* (analog) i 7*R*-konfiguracije (kontrola), (*Tabela 4.15*).

Iz *Tabele 4.15* vidi se da su prema PC3 ćelijskoj liniji aktivni samo triciklični analog **II.6** i metoksi derivat krasalaktona B **III.4** koji su 7*S*-konfiguracije. Prema HT-29 ćelijama jače antiproliferativno dejstvo ispoljavaju kontrolni molekul 7*R*-konfiguracije **I.1** (vrednost  $\Delta\log(IC_{50})$  pozitivna) i analog **II.6** 7*S* konfiguracije (vrednost  $\Delta\log(IC_{50})$  negativna), a od upoređenih tricikličnih analoga sa fenol funkcijom i nitro derivata krasalaktona C aktivni su jedino 7*R*-izomeri **II.3**, **IV.2** i 7*S*-izomer **III.4**. U kulturi Hs294T inhibitorno dejstvo imaju pojedini izomeri 7*S*-konfiguracije (**I.2**, **II.6**) i 7*R*-konfiguracije (**II.3**). Većina izomera je aktivna prema A549 ćelijama. Pri tome su aktivniji molekuli 7*S*-konfiguracije (**I.2**, **IV.6**, **IV.7**), od konformaciono krutih izomera aktivan je samo molekul 7*S*-konfiguracije (**II.4**) dok su nitro izomeri krasalaktona B (**III.4** i **III.2**) slične aktivnosti ( $\Delta\log(IC_{50})$  0,005).

U analizi korelacije između strukture krasalaktona B i C, njihovih novosintetizovanih derivata i antiproliferativne aktivnosti kao analozi posmatrani su krasalakton B (**III.1**) i njegovi derivati (**III.2** - **III.5**) a kontrolni molekuli bili su krasalakton C (**IV.1**) i njegovi derivati **IV.3**, **IV.4**, **IV.6**, **IV.7**, redom (*Tabela 4.16*).

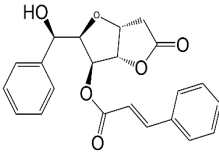
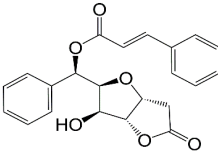
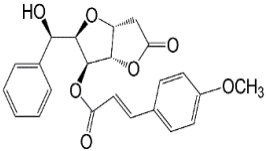
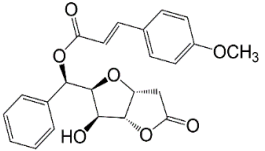
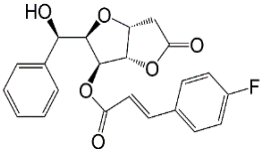
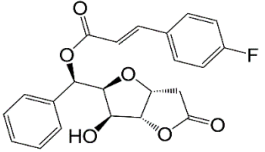
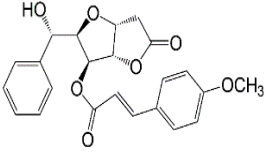
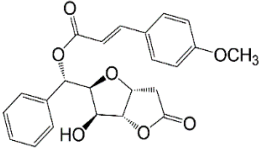
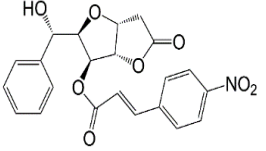
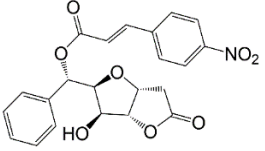
Prirodni krasalaktoni B i C i njihovi upoređivani novosintetizovani analozi ne deluju antiproliferativno na Hs294T ćelijsku liniju. Takođe, 7*R*-metoksi derivati (**III.2**, **IV.3**) i 7*R*-fluoro derivati (**III.3**, **IV.4**) ne ispoljavaju citotoksičnost prema PC3 i HT-29 ćelijama. U tim kulturama aktivnost pokazuju 7*S*-metoksi (**III.4**) i 7*S*-nitro (**III.5**) derivati krasalaktona B. Prema A549 ćelijskoj liniji aktivniji su prirodni krasalakton C (**IV.1**) i njegovi fluoro i metoksi derivati 7*R*-konfiguracije (**IV.3**, **IV.4**) i metoksi i nitro derivati 7*S*-konfiguracije (**IV.6**, **IV.7**) dok je prema PC3 kulturi nešto aktivniji krasalakton B (**III.1**), (*Tabela 4.16*).

Tabela 4.15. Korelacija između apsolutne konfiguracije na 7C atomu i antiproliferativne aktivnosti molekula

Upoređivana jedinjenja		$\Delta \log(IC_{50})$			
		Ćelijske linije			
Analog (7S)	Kontrola (7R)	PC3	HT-29	Hs294T	A549
 I.2	 I.1	na	0,356	I.2	-0,224
 II.4	 II.3	na	II.3	II.3	II.4
 II.6	 II.5	II.6	-1,009	II.6	na
 III.4	 III.2	III.4	III.4	na	0,088
 IV.6	 IV.2	na	IV.2	na	-0,426
 IV.7	 IV.3	na	IV.3	na	-0,111

IC<sub>50</sub> – koncentracija jedinjenja koja inhibira rast 50% ćelija u poređenju sa netretiranom kontrolom; na – nije aktivan ni 7S- ni 7R-stereoizomer

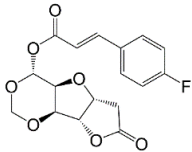
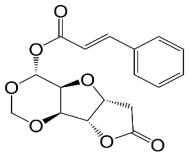
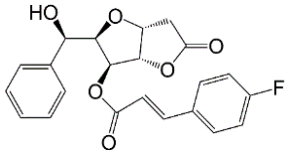
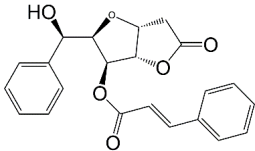
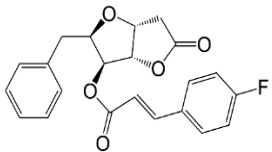
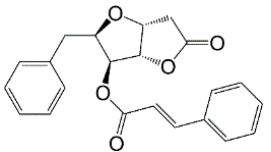
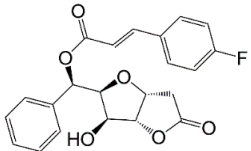
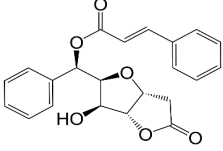
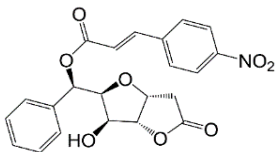
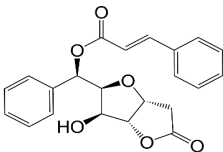
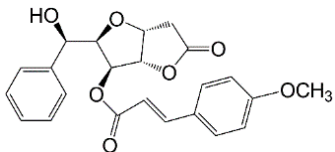
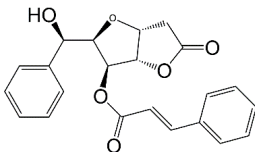
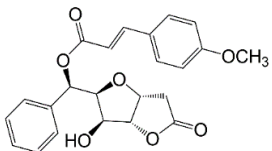
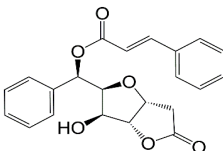
Tabela 4.16. Korelacija između strukture krasalaktona B i C, njihovih derivata i antiproliferativne aktivnosti

Upoređivana jedinjenja		$\Delta\log(IC_{50})$			
		Ćelijske linije			
Analog	Kontrola	PC3	HT-29	Hs294T	A549
 <b>III.1</b>	 <b>IV.1</b>	-0,092	<b>IV.1</b>	na	0,227
 <b>III.2</b>	 <b>IV.3</b>	na	<b>IV.3 (na)</b>	na	0,309
 <b>III.3</b>	 <b>IV.4</b>	na	na	na	0,235
 <b>III.4</b>	 <b>IV.7</b>	<b>III.4</b>	<b>III.4</b>	na	0,508
 <b>III.5</b>	 <b>IV.6</b>	<b>III.5</b>	<b>III.5</b>	na	0,428

$IC_{50}$  – koncentracija jedinjenja koja inhibira rast 50% ćelija u poređenju sa netretiranom kontrolom; na – nije aktivan ni analog ni kontrolni molekul

Da bi se utvrdila korelacija između vrste funkcionalnih grupa u *para* položaju benzenovog prstena cinnamoyl ostatka i antiproliferativne aktivnosti novosintetisanih stilir laktona kao analozi posmatrani su molekuli sa fluoro (**III.7**, **III.3**, **III.7**, **IV.4**), nitro (**IV.2**) i metoksi (**III.2**, **IV.3**) funkcionalnim grupama, a kao kontrola odgovarajući molekuli bez funkcionalnih grupa u aromatičnom prstenu (**III.5**, **III.1**, **III. 6**, **IV.1**). Rezultati ovih razmatranja prikazani su u Tabeli 4.17.

Tabela 4.17. Korelacija između vrste funkcionalnih grupa i antiproliferativne aktivnosti molekula

Upoređivana jedinjenja		Grupa	$\Delta \log (IC_{50})$			
			Ćelijske linije			
Analog	Kontrola		PC3	HT-29	Hs294T	A549
 <b>II.7</b>	 <b>II.5</b>	F	<b>II.7</b>	<b>II.5</b>	<b>II.7</b>	na
 <b>III.3</b>	 <b>III.1</b>	F	<b>III.1</b>	na	na	0,924
 <b>III.7</b>	 <b>III.6</b>	F	na	na	na	-0,263
 <b>IV.4</b>	 <b>IV.1</b>	F	<b>IV.1</b>	<b>IV.1</b>	na	0,916
 <b>IV.2</b>	 <b>IV.1</b>	NO <sub>2</sub>	na	1,370	na	1,058
 <b>III.2</b>	 <b>III.1</b>	OCH <sub>3</sub>	<b>III.1</b>	na	na	0,765
 <b>IV.3</b>	 <b>IV.1</b>	OCH <sub>3</sub>	<b>IV.1</b>	<b>IV.1</b>	na	0,683

IC<sub>50</sub> – koncentracija jedinjenja koja inhibira rast 50% ćelija u poređenju sa netretiranom kontrolom; na – nije aktivan ni analog ni kontrolni molekul

Rezultati u *Tabeli 4.17* ukazuju da se uvođenjem samo elektron-akceptorske grupe F u molekul tricikličnog analoga postiglo da dobijeni derivat **II.7** ima značajnu aktivnost prema PC3 ćelijama i submikromolarnu aktivnost u kulturi Hs294T (*Tabela 4.12*). Takođe, ista funkcionalna grupa doprinela je povećanju aktivnosti izostere **III.7** u odnosu na kontrolni molekul **III.6** u A549 kulturi. Međutim, ovi molekuli su neaktivni prema drugim ćelijskim kulturama. Ostali derivati sa F grupom, odnosno sa NO<sub>2</sub> i OCH<sub>3</sub> grupama, ili ne pokazuju aktivnost kao ni kontrolni molekuli (**III.7** i **III.6**, **III.2** i **III.1** prema ćelijama HT-29 i Hs294T, **IV.2** i **IV.1** prema PC3 i Hs294T kulturi, **IV.3** i **IV.1** prema Hs294T kulturi), ili je citotoksičnost kontrolnih molekula veća od analoga u slučaju ćelija A549. Interesantno je da je samo molekul **II.7** aktivan prema ćelijama Hs294T, a da samo on i molekul **II.5** ne ispoljavaju delovanje u kulturi A549. Vrednosti  $\Delta\log(IC_{50})$  ukazuju da su metoksi derivati krasalaktona B i C (**III.2**, **IV.3**) nešto aktivniji od fluoro (**III.3**, **IV.4**) i nitro derivata (**IV.2**).

SAR analiza je pokazala da strukturne osobine stiril laktona utiču na antiproliferativnu aktivnost sintetizovanih stiril laktona. Uvođenje prstena u osnovne molekule (+)-goniofufuron i 7-*epi*-(+)-goniofufuron, cinamiol funkcije i F grupe u triciklične analoge kao i funkcionalnih grupa F, NO<sub>2</sub> i OCH<sub>3</sub> u *para* položaj cinamatnog aromatičnog prstena kod derivata krasalaktona B i C različito se odražava na antiproliferativnu aktivnost molekula i zavisi od vrste ćelijske linije. Najveći efekat odnosno nanomolarna aktivnost molekula (IC<sub>50</sub> 2,1 nM) postignuta je uvođenjem 1,2-dioksan prstena i fluorocinamoil funkcije (molekul **II.7**) i to prema ćelijama Hs294T. Međutim, ovaj molekul ima zadovoljavajuću aktivnost prema PC3 ćelijskoj liniji dok je neaktivan prema kulturama HT-29 i A549.

#### 4.5. Molekulski doking i 3D-QSAR analiza ispitivanih stiril laktona

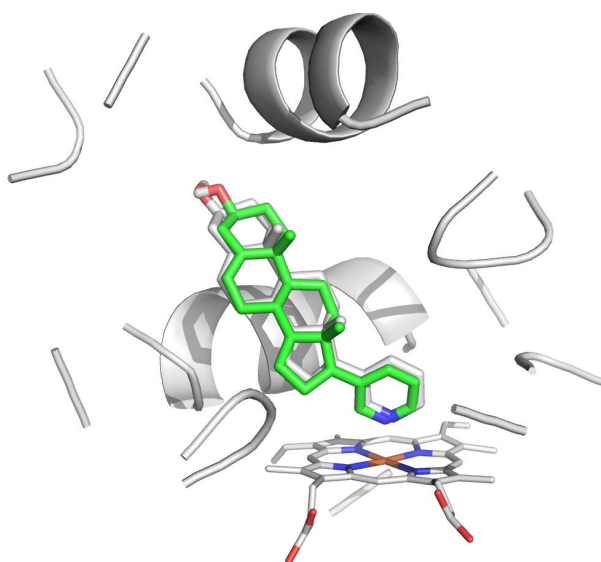
Kancer prostate je čest uzrok smrti kod muškaraca. Kako hemoterapija i terapija zračenjem uglavnom nisu efektivne, razvijaju se nove metode tretmana ovog tumora (Shin i sar., 2012; Shizard i sar., 2015). S obzirom na to da su neki ispitivani stiril laktoni ispoljili antiproliferativnu aktivnost prema ćelijama kancera prostate (PC3), (*Tabela 4.12*), da bi se utvrdili načini vezivanja liganda odnosno aktivnog jedinjenja i odgovarajuće međumolekulske interakcije koje stabilizuju kompleks ligand-receptor urađena je simulacija molekulskog dokinga sa receptorom Citohrom P450 17A1. Ovaj enzim je značajan za tretman kancera prostate i dojke (DeVore i Scott, 2012). Takođe, razvijen je prediktivni 3D-QSAR model koji će biti korišćen za optimizaciju i ispitivanje novih jedinjenja. Ovi modeli će pružiti detaljne

informacije za bolje razumevanje mehanizma inhibicije Citohroma P450 17A1 i pomoći dizajnirati nove inhibitory.

#### 4.5.1. Molekulski doking

Jedinjenja sa najvišom i najnižom antiproliferativnom aktivnošću prema PC3 ćelijama kao i abirateron, poznati inhibitor ciljanog enzima Citohrom P450 17A1 i jedinjenje koje se danas koristi u tretmanu kancera prostate, poslužili su kao ligandi u pojedinim analizama molekulskim dokingom. Abirateron ima visok afinitet prema Citohromu P450 17A1 i vezuje se za gvožđe u hemu (DeVore i Scott, 2012). Korišćenjem protokola molekulskog dokinga, urađen je zadovoljavajući re-doking abiraterona sa strukturom humanog Citohroma P450 17A1 koja je određena difrakcijom X-zraka. Vrednost korena srednjeg kvadrata odstupanja, RMSD (eng. *Root Mean Square Deviation*) iznosila je 0,464 Å (Slika 4.49), što je ukazalo da je protokol odgovarajući za simulaciju molekulskog dokinga sa visokom tačnošću.

Rezultati doking simulacije (Tabela 4.18) pokazuju da su sve strukture ispitivanih stilir laktona sposobne da interaguju sa enzimom Citohrom P450 17A1, što je u skladu sa SurflexDock instrukcijama budući da se ukupni rezultat (*skor*) iznad 6 može smatrati pozitivnim vezivanjem.



Slika 4.49. Re-doking abiraterona prisutnog u kristalnoj strukturi Citohroma P450 17A1 (PBD, ID: 3RUK:A), sa RMSD vrednosti 0,464 Å

zeleno – re-dokingovan molekul abiraterona

Tabela 4.18. Doking rezultati abiraterona i analiziranih stiril laktona

Jedinjenje	Doking skor (Surflex-Dock)	Razmak od Fe <sup>2+</sup>
Abirateron	10,892	2,1
<b>II.7</b>	8,341	2,2
<b>II.6</b>	8,080	2,1
<b>III.5</b>	8,687	1,9
<b>III.1</b>	9,287	2,0
<b>IV.1</b>	8,465	2,0
<b>III.4</b>	8,172	1,9
<b>III.2</b>	8,722	3,3
<b>IV.5</b>	12,120	1,9
<b>II.2</b>	6,680	4,3
<b>IV.3</b>	9,151	4,6
<b>II.4</b>	6,441	2,0
<b>I.1</b>	6,512	2,1

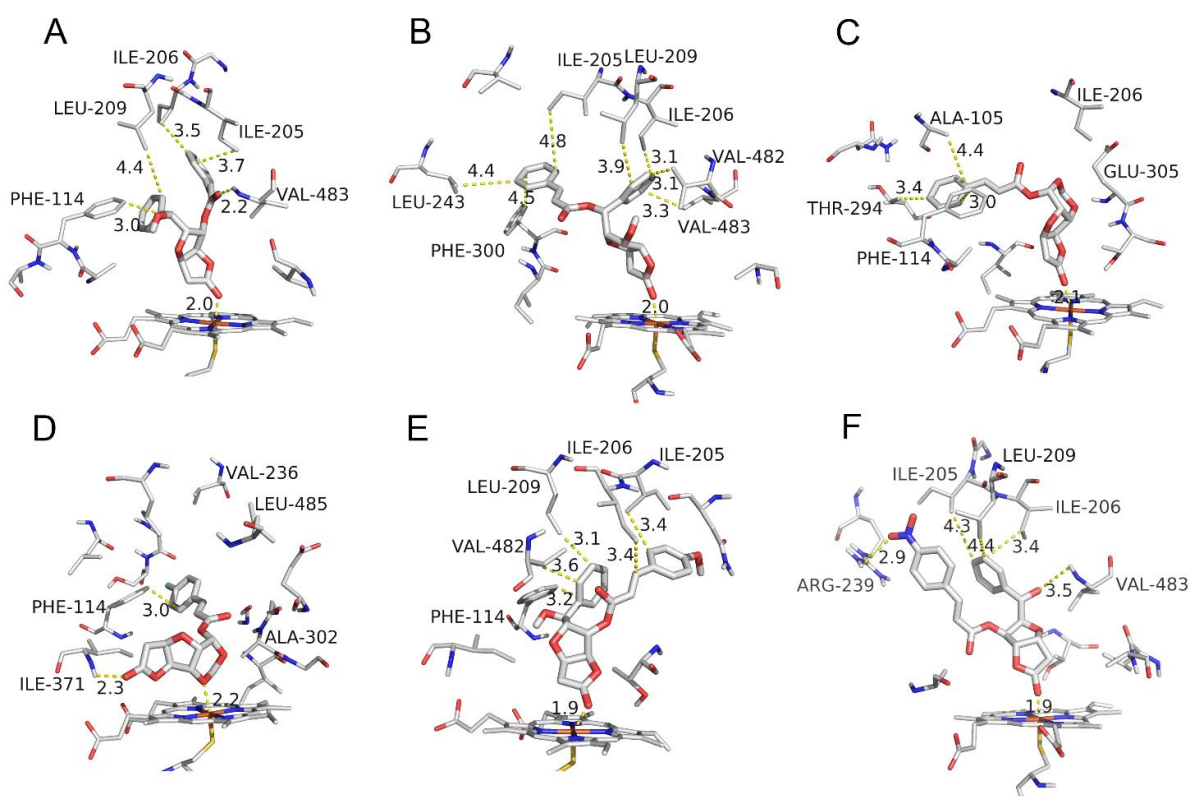
Najveći citotoksični efekat na PC3 ćelije među testiranim jedinjenjima postignut je nakon tretmana sa jedinjenjima **II.7** i **II.6** (Tabela 4.12). Ova jedinjenja su slične strukture, osim što se razlikuju u stereochemiji na C-7 atomu i prisustvu F atoma u jedinjenju **II.7**, koji ne interaguje sa proteinom (Slika 4.50). Poznato je da fluor ima toksično delovanje, pa je zato mogao povećati citotoksični efekat jedinjenja **II.7**. Prema doking simulaciji, jedinjenje **II.7** može graditi koordinativno-kovalentne interakcije sa Fe<sup>2+</sup> jonom (2,2 Å). Nadalje, ono gradi vodonične veze sa Ile371 (2,3 Å), kao i hidrofobne interakcije sa Phe114 (3,0 Å) preko fenil prstena estarske grupe cimetne kiseline (cinamoil grupa) na C-7 atomu, koji je odgovoran za visoki afinitet vezivanja za enzim. Mada jedinjenje **II.6** ima sličnu strukturu jedinjenju **II.7**, njegova veza orijentisana ka proteinu je različita. Atom fluora gura aromatični prsten cinamoata unazad u jedinjenju **II.7** u poređenju sa jedinjenjem **II.6**, što rezultuje različitim vezivanjem za Fe<sup>2+</sup>. Jedinjenje **II.6** udaljeno je 2,1 Å od Fe<sup>2+</sup> jona i takođe može graditi hidrofobne interakcije sa Phe114 (3,0 Å), Thr294 (3,4 Å) i Ala105 (4,4 Å).

Prirodna jedinjenja **III.1** i **IV.1**, koja takođe pokazuju jaku inhibitornu aktivnost, imaju sličnu udaljenost od Fe<sup>2+</sup> (2,0 Å oba). Jedinjenje **III.1** gradi polarne interakcije sa NH grupom Val483 (2,2 Å) kao i hidrofobne interakcije sa Ile205 (3,5 Å) i Ile206 (3,7 Å) preko cinamoil grupe na C-5 atomu i Leu209 (4,4 Å) i Phe114 (3,0 Å) preko fenil grupe na C-7



atomu. Jedinjenje **IV.1** gradi hidrofobne interakcije sa Phe300 (4,5 Å), Leu243 (4,4 Å) i Ile205 (4,8 Å) preko cinamoil grupe na C-7 atomu i Ile206 (3,1 Å), Leu209 (3,9 Å), Val482 (3,1 Å) i Val483 (3,3 Å) preko fenil grupe na C-5 atomu.

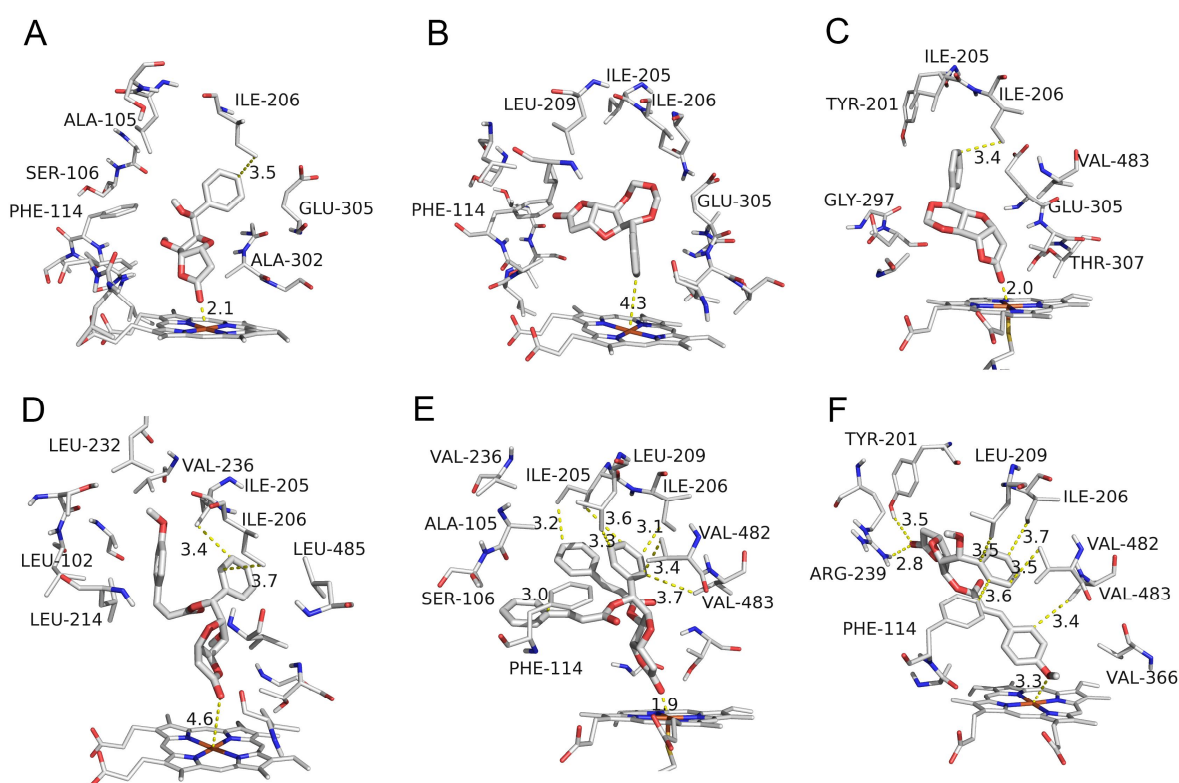
Jedinjenja **III.4** i **III.5** imaju slične strukture i vezu orijentisanu kao jedinjenje **III.1** i takođe umerenu citotoksičnu aktivnost prema PC3 ćelijama. NO<sub>2</sub> grupa, koja je prisutna u *para* položaju cinamoatnog aromatičnog prstena u jedinjenju **III.5**, interaguje sa Arg239, dok OCH<sub>3</sub> grupa u jedinjenju **III.4** nema mogućnost da interaguje sa proteinom što uzrokuje slabije vezivanje za protein u poređenju sa jedinjenjima **II.7** i **III.1**.



Slika 4.50. Simulacija molekulskog dokinga jedinjenja sa visokom citotoksičnom aktivnošću: (A) jedinjenje **III.1**; (B) jedinjenje **IV.1**; (C) jedinjenje **II.6**; (D) jedinjenje **II.7**; (E) jedinjenje **III.4**; (F) jedinjenje **III.5**

Jedinjenja koja se smatraju neaktivnim ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ) vezuju se slabije za protein. Jedinjenje **IV.3** je u takvom položaju da nema mogućnost građenja koordinativno-kovalentne veze sa Fe<sup>2+</sup> jonom (4,6 Å) što uzrokuje nisku energiju vezivanja za enzim kao i nepostojanje inhibitorne aktivnosti (Slika 4.51) bez obzira na visok doking skor (Tabela 4.18) i cinamoil grupu koja gradi hidrofobne interakcije sa proteinom (Ile205 (3,4 Å), i Ile206 (3,7 Å)).

Mogućnost koordinativno-kovalentnih interakcija sa  $\text{Fe}^{2+}$  jonom pokazala se kao potrebna (ali ne i dovoljna) osobina za inhibitornu aktivnost. Jedinjenje **I.2** ima najveću  $\text{IC}_{50}$  vrednost (Tabela 4.12). Ono nema cinamoil grupu i preko fenil grupe gradi samo jednu hidrofobnu interakciju sa Ile206 (3,5 Å). Sličnu  $\text{IC}_{50}$  vrednost i orijentaciju veze ima molekul **II.4**, dok molekul **II.2** nema mogućnost koordinativno-kovalentnih interakcija sa  $\text{Fe}^{2+}$  jonom što ima za posledicu odsustvo inhibitorne aktivnosti. Jedinjenje **III.2** ima istu molekulsku formula kao jedinjenje **III.4**, ali zbog različite stereochemije (Tabela 3.1) ono različito interaguje sa enzimom (ne gradi koordinativno-kovalentnu vezu sa  $\text{Fe}^{2+}$  (3,3 Å)) i zato nema citotoksičnu aktivnost.



Slika 4.51. Simulacija molekulskog dokinga jedinjenja sa niskom citotoksičnom aktivnošću: (A) jedinjenje **I.2**; (B) jedinjenje **II.2**; (C) jedinjenje **II.4**; (D) jedinjenje **IV.3**; (E) jedinjenje **IV.5**; (F) jedinjenje **III.2**

Mada jedinjenje **IV.5** ima estarske grupe cimetne kiseline u povoljnim položajima (atomi C-5 i C-7) i doking simulacija pokazuje povoljan skor vezivanja i orijentacije (najveći doking skor među ispitivanim jedinjenjima, Tabela 4.18), njegova  $\text{IC}_{50}$  vrednost je iznad 100  $\mu\text{M}$  i ono ne pokazuje citotoksičnu aktivnost. To se može objasniti činjenicom da ono odstupa od „pravilo od 5“ Lipinskog (Lipinski i sar., 2001). Ovo jedinjenje ima molekulsku masu

preko 500 i  $\log P$  preko 5. Zbog toga ima nisku membransku permeabilnost i verovatno nije sposobno da unutar ćelije interaguje sa enzimom.

#### 4.5.2. 3D-QSAR analiza

Simulacija molekuskog dokinga pokazala je da svi molekuli stiril laktone imaju mogućnost da se vežu za protein. Zato su svi oni, izuzev molekula **IV.5** koji odstupa od pravila Lipinskog (Lipinski i sar., 2001), korišćeni za konstrukciju 3D modela bez obzira na  $IC_{50}$  vrednosti molekula prema PC3 ćelijskoj liniji (*Tabela 4.12*).

Trodimenzionalna kvantitativno-strukturna analiza, odnosno analiza između strukture i aktivnosti, tj, 3D-QSAR model postavljen je korišćenjem CoMFA i CoMSIA metoda. Set od 23 liganda je nasumce podeljen u dva subseta: trening set (19 jedinjenja) i test set (4 jedinjenja). Robustnost i mogućnost predikcije dobijenog modela ispitana je korišćenjem test seta.

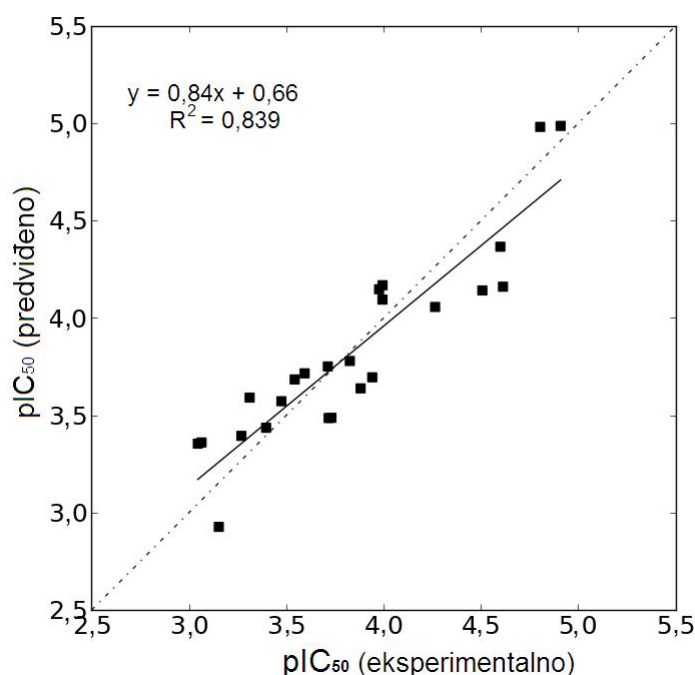
Statistički parametri 3D-QSAR analize prikazani su u *Tabeli 4.19* iz kojih se može zaključiti da postoji dobra korelacija između predviđenih i eksperimentalnih vrednosti inhibitorne aktivnosti ispitivanih molekula,  $\log(IC_{50})$  ( $R^2 = 0,84$  i  $Q^2 = 0,64$ ). To ukazuje na dobru predvidivost dobijenog modela.

*Table 4.19.* Statistički parametri dobijeni za 3D-QSAR model

Statistički parametri	QSAR model
SD <sup>1</sup>	0,240
R <sup>2</sup>	0,839
R <sup>2Scramble</sup> (Robusnost)	0,723
Stabilnost	0,54
F	46,9
p	7,28e <sup>-0,08</sup>
Q <sup>2</sup>	0,640
R (Pirson)	0,928
Udeli doprinosa polja	
Gaussian sterno	0,497
Gaussian elektrosatatičko	0,092
Gaussian hidrofobno	0,229
Gaussian H donor	0,138
Gaussian H akceptor	0,043

<sup>1</sup>SD – standardna devijacija; p – nivo značajnosti;  
Nazivi statističkih parametara dati su u poglavljima 3.4.5. i 3.8.

Na *Slici 4.52* prikazan je grafik odnosa eksperimentalno dobijenih  $\log(IC_{50})_{\text{eksperimentalno}}$  vrednosti prema predviđenim  $\log(IC_{50})_{\text{predviđeno}}$  vrednostima dobijenih 3D-QSAR metodom. Raspodela podataka oko regresione linije ( $R^2=0,84$ ), kao i ostali statistički parametri (SD, robusnost, F, p;  $R^2 > 0,8$ ;  $Q^2 > 0,5$  (Veerasamy i sar., 2011)) jasno ukazuju da je model dovoljno tačan da bi bio korišćen u daljim analizama.

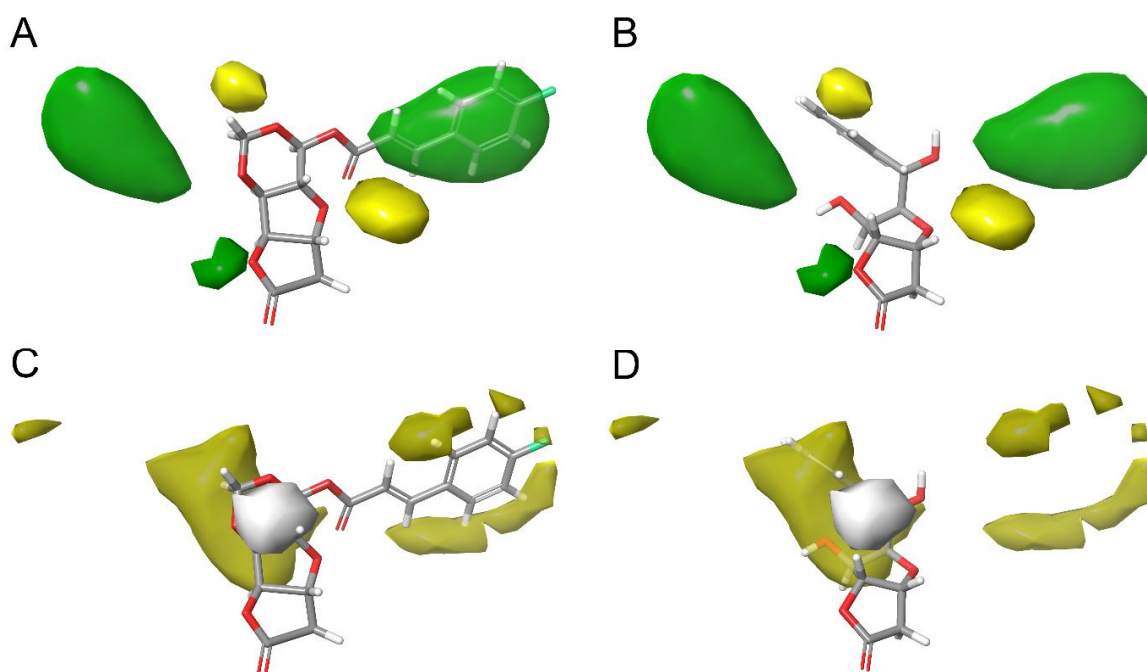


*Slika 4.52.* Grafik odnosa eksperimentalnih i predviđenih  $pIC_{50}$  vrednosti stilben laktona

*Puna linija* – regresiona linija za fitovanje i predviđene bioaktivnosti trening i test seta

Velika prednost 3D-QSAR modelovanja jeste vizuelizacija rezultata u vidu 3D konturnih grafika, koji su korisni za dalje razumevanje i poboljšanje regiona vezivanja receptor-ligand (Liu i sar., 2011). Analizirane su strukturne karakteristike koje uključuju sterno (prostorno) polje, donorske vodonične veze, akceptorske vodonične veze, hidrofobne/nepolarne interakcije i elektrostatičke osobine. Najznačajnija karakteristika (sterna karakteristika) QSAR modela vizuelizovana je pomoću jedinjenja sa najvećom inhibitornom aktivnošću odnosno ligandom **II.7** i jedinjenja sa najnižom aktivnošću **I.2** (*Slike 4.53A* i *4.53B*, redom). Zelena površina pokazuje pogodne sterne regione u estarskoj grupi cimetne kiseline (cinamoil grupa), koji bi mogli biti korisni za dalje poboljšanje aktivnosti jedinjenja. Dok se jedinjenje **II.7** uklapa u predviđeni model jer poseduje estarsku grupu, jedinjenje **I.2**, koje nema estarsku grupu, ne zauzima položaj u pozitivnom sternom regionu. Dobijeni rezultati ukazuju da su sterna efekti (frakcija polja 0,497) u estarskoj grupi cimetne kiseline

presudni za citotoksičnu aktivnost molekula. Ovo je u skladu sa rezultatima doking analize, prema kojima jedinjenje sa najvećom citotoksičnom aktivnošću ima cinamoil grupu postavljenu u hidrofobni džep (eng. *pocket*) koja gradi jake hidrofobne interakcije sa proteinom. Usled toga, jedinjenja **II.5 – II.7**, **III.1 – III.7**, **IV.1 – IV.7**, koja sadrže ovu grupu, u najviše slučajeva pokazuju veću citotoksičnost. Naravno, to nije uvek tako s obzirom na to da jedinjenja različite stereochemije imaju različitu aktivnost. Na primer, jedinjenja **III.2** i **III.4** imaju istu formulu ali različitu stereochemiju (*Tabela 3.1*), koja utiče na bitne razlike u vezivanju proteina i citotoksičnu aktivnost (*Tabela 4.12*). Zato je za predviđanje aktivnosti jedinjenja značajno da se uključi njegova trodimenzionalna struktura kako bi se dobili pouzdaniji rezultati.



*Slika 4.53.* Konturna mapa sternog efekta (zeleno: povoljno; žuto: nepovoljno) i hidrofobnog efekta: (A) konturna mapa sternog efekta jedinjenja **II.7**; (B) konturna mapa sternog efekta jedinjenja **I.1**; (C) konturna mapa hidrofobnog efekta jedinjenja **II.7**; (D) konturna mapa hidrofobnog efekta jedinjenja **I.2**

Žuto–povoljno; belo–nepovoljno

Pored navedenog, sterna karakteristika, Gausove hidrofobne grupe (eng. *Gaussian hydrophobic groups*) oko estarskih grupa cimetine kiseline doprinosi inhibitornoj aktivnosti jedinjenja. Na *Slikama 4.53C i 4.53D* prikazana je Gausova hidrofobna karakteristika QSAR

modela sa najpotentnijim odnosno najboljim inhibitorom, jedinjenjem **II.7**, i sa najmanje aktivnim inhibitorom, jedinjenjem **I.2**. Žute površine pokazuju povoljne Gaussianove hidrofobne regione, a bela površina nepovoljan region. Istaknuto je da je povoljna žuta površina prisutna oko estarske grupe cimetne kiseline jedinjenja **II.7**, dok jedinjenje **I.2** ima žutu površinu na furano-furanonskom prstenu. Nadalje, zelena površina (pozitivna sterna karakteristika) se veoma dobro slaže sa žutom površinom (pozitivni Gaussianovi hidrofobni regioni) prikazanog liganda. U odnosu na inhibitornu aktivnost stiril laktona, veliki hidrofobni supstituenti su prioritarno na C-7 atomu i mogu povećati aktivnost leka. Štaviše, hidrofobni supstituent je takođe povoljan na C-5 atomu što su potvrdili i rezultati molekulskog dokinga. Poseban slučaj je jedinjenje **IV.5**, koje ima estarske grupe cimetne kiseline na oba, C-5 i C-7 atomima, što prouzrokuje najveći doking skor (*Tabela 4.18*). Ipak, zbog ograničenja kao što su „pravilo od 5” Lipinskog (Lipinski i sar., 2001), ono ima lošu permeabilnost i pa ne pokazuje citotoksičnu aktivnost prema PC3 ćelijama. Žuta površina uz fenil grupu ukazuje da će hidrofobni supstituenti u ovom području povećati inhibitornu aktivnost jedinjenja.

Interakcije identifikovane iz 3D konturnih mapa su u dobroj korelaciji sa specifičnim interakcijama između inhibitora odnosno stiril laktona i rezidua amino kiseline enzima Citohrom P450 17A1 što je razmatrano u doking analizi i ukazuju na robusnost ustanovljenih 3D-QSAR modela.

Glavno ograničenje CoMFA/CoMSIA i drugih 3D-QSAR metoda jeste njihova ograničena primena samo na statične strukture hemijskih analoga, čime je zanemarena dinamička priroda liganada (Acharaya i sar., 2011). Oni ukazuju da dobijeni 3D-QSAR modeli mogu da pomognu u ispitivanju i pribavljanju daljih smernica za dizajniranje jedinjenja sa boljim inhibitornim potencijalom.

## 5. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata i diskusije u vezi sa izvedenim analizama ispitivanih stiril laktona, izvedeni su sledeći zaključci:

- ❖ Retenciono ponašanje jedinjenja u hromatografiji na obrnutim fazama slično je u pokretnim fazama metanol-voda i acetonitril-voda (pH 3,28), izuzev što u acetonitrilu jedinjenja imaju manju retenciju. Jedinjenja se ponašaju u skladu sa svojom polarnošću, tj. najpolarnija jedinjenja imaju najmanju retenciju, a najhidrofobnija najveću. Hidrofobnost jedinjenja i retencija povećavaju se uvođenjem benzil grupe, cikličnog prestena i/ili estarske grupe cimetne kiseline u molekul osnovnih jedinjenja.
- ❖ Stereoizomeri (+)-goniofufuron i 7-*epi*-(+)-goniofufuron, kao i stereoizomeri krasalaktone B i C imaju međusobno gotovo istu retenciju za razliku od stereoizomera tricikličnih laktone.
- ❖ Zavisnost retencije jedinjenja od zapreminskog udela metanola i acetonitrila u pokretnoj fazi je linearna, prave su paralelne pa se konstante  $\log k_o$  i  $S$  ovih zavisnosti mogu koristiti za tumačenje retencije jedinjenja i za različite korelacije.
- ❖ Korelacijom hromatografskih retencionih konstanti  $\log k_o$  i  $S$  sa *in silico* parametrima lipofilnosti stiril laktone utvrđeno je da se te konstante mogu koristiti kao hromatografski parametri lipofilnosti stiril laktone, posebno one određene u pokretnoj fazi metanol-voda. Iz ove analize izuzeto je jedinjenje sa dve cinamatne grupe, koje je imalo uglavnom velike vrednosti *in silico* parametara lipofilnosti.
- ❖ Hijerarhijskom klaster analizom jedinjenja na osnovu konstante  $\log k_o$  dobijena su dva dobro odvojena klastera za obe pokretne faze, ali jedinjenja nisu grupisana na isti način. To ističe neke razlike u ponašanju jedinjenja u hromatografskom sistemu na obrnutim fazama.
- ❖ Klasterovanjem jedinjenja zasnovanom na *in silico* deskriptorima lipofilnosti takođe su dobijana dva klastera – jedan sa jedinjenjima koja imaju veliku retenciju, visoke

vrednosti  $\log P$  i  $\log D$  i niže  $\log S$  vrednosti, a drugi sa jedinjenjima koja imaju malu retenciju, niske vrednosti  $\log P$  i  $\log D$  i veće  $\log S$  vrednosti.

- ❖ *In silico* molekulski deskriptori upotrebljeni su za postavljanje odgovarajućih modela kvantitativne zavisnosti između strukture i retencione konstante  $\log k_o$  odnosno QSRR modela. I u ovom slučaju smeša metanol-voda se pokazala kao bolja pokretna faza. Najbolji modeli izabrani su na osnovu statističkih parametara interne i eksterne provere. U višestrukim linearnim regresionim modelima figurišu po dva parametra lipofilnosti, što potvrđuje da je za hromatografsku retenciju lipofilnost glavna osobina molekula. U svakoj od korelacija javlja se i po jedan ADME (apsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija) deskriptor.
- ❖ Korelacije između eksperimentalno dobijenih i na osnovu QSRR modela predviđenih retencionih podataka  $\log k_o$  su veoma dobre. Koeficijenti determinacije  $R^2$  za linearne regresione modele su iznad 0,8, a za višestruke linearne regresione modele iznad 0,9. Prediktivna mogućnost utvrđenih QSRR modela je takva da omogućava računanje lipofilnosti stiril laktone i sličnih jedinjenja i predviđanje njihovog hromatografskog ponašanja.
- ❖ Na osnovu „pravila od 5” Lipinskog, samo za dicinamat, jedinjenje koje ima molekulska masa iznad 500 i parametar lipofilnosti  $\text{Clog}P$  veći od 5, očekivala se loša apsorpcija. Za ostala jedinjenja korelisane su vrednosti hromatografskih parametara lipofilnosti  $\log k_o$  i  $S$  sa *in silico* farmakokinetičkim parametrima: konstanta apsorpcije ( $k_a$ ), zapremina distribucije ( $V_d$ ), humana efektivna permeabilnost u jejunumu ( $P_{eff}$ ), nevezana frakcija jedinjenja u plazmi ( $FUP$ ), vezivanje molekula za proteine plazme ( $PPB$ ), logaritam podeonog koeficijenta krvno-moždane barijere ( $\log BB$ ), humana intestinalna apsorpcija ( $HIA$ ), propustljivost ćelija adenokancera debelog creva ( $Caco-2$ ). Sve korelacije, osim sa  $\log BB$ ,  $HIA$  i  $Caco-2$ , su linearne i/ili parabolične sa podešenim koeficijentom determinacije  $R^2_{adj}$  iznad 0,7.
- ❖ Na farmakokinetičke osobine stiril laktone utiču različite osobine molekula izražene molekulskim deskriptorima: lipofilnost molekula na  $k_a$ ,  $V_d$ ,  $FUP$ ,  $PPB$ ; površinski napon na  $k_a$ ,  $V_d$ ,  $P_{eff}$ ; broj rotabilnih veza na  $P_{eff}$ ,  $FUP$ ; broj akceptorskih vodoničnih veza na  $k_a$ ; broj donorskih vodoničnih veza na  $\log BB$ ; broj alifatičnih C atoma na  $FUP$ ; geometrijski deskriptori Dreiding-ova i MMFF94 energije na  $PPB$ .
- ❖ Nisu dobijene značajnije korelacije između hromatografskog lipofilnog parametra  $\log k_o$  i *in silico* farmakoloških parametara stiril laktone GPCR liganada, modulatora



jonskog kanala (*ICM*), nuklearnih receptora (*NRL*), inhibitora kinaze (*KI*), proteaze (*PI*) i enzima (*EI*).

- ❖ Ispitivani stiril laktoni, sa izuzetkom dicinamata, neaktivni su prema normalnim ćelijama fetalnih fibroplasta pluća, MRC-5. Antiproliferativna aktivnost molekula ispitana je i prema četiri nove humane maligne ćelijske linije: kancer prostate (PC3), kancer debelog creva (HT-29), melanom (Hs294T) i adenokarcinom pluća (A549). Najaktivnije novosintetizovano jedinjenje je triciklični 4-fluorocinamatni derivat, koji ispoljava nanomolarnu aktivnost ( $IC_{50}$  2,1 nM) prema ćelijama melanoma (Hs294T) i aktivniji je preko 2250 puta od komercijalnog antitumorskog agensa doksorubicina (DOX). Od DOX veću aktivnost ima još nekoliko novosintetizovanih molekula: 7*S*-metoksi i 7*S*-nitro derivati krasalaktona B prema ćelijama kancera prostate (PC3), 7*S*-triciklični cinamoil derivat prema ćelijama melanoma (Hs294T). DOX je manje aktivan od prirodnih krasalaktona B i C prema ćelijama kancera prostate i adenokarcinoma pluća (A549). Ostali aktivni stiril laktoni ispoljavaju umerenu do slabu citotoksičnost prema ispitivanim malignim ćelijama.
- ❖ Prilikom ispitivanja korelacionih odnosa između strukture i antiproliferativne aktivnosti novosintetizovanih analoga i osnovnih molekula stiril laktona (SAR), citotoksičnost je kvantitativno izražena razlikom dekadnih logaritama  $IC_{50}$  vrednosti analoga i kontrolnog molekula. Uticaj strukture molekula i konfiguracije na C-7 atomu zavisi od ćelijske linije. Uvođenje dodatnog prstena u molekul prirodnih proizvoda ne povećava antiproliferativnu aktivnost analoga. Krasalaktoni B i C i njihovi sintetički analozi ne inhibiraju antiproliferaciju ćelija melanoma, dok su prema ćelijama adenokarcinoma pluća aktivniji krasalakton C i njegovi derivati. Zamena fenil funkcije cinamoil funkcijom u 7*S* položaju utiče na aktivnost molekula prema ćelijama kancera prostate, debelog creva i melanoma. Uvođenje F grupe u *para* položaj benzenovog prstena cinamoil ostatka samo kod tricikličnog analoga bitno povećava aktivnosti molekula prema ćelijama kancera prostate i naročito ćelijama melanoma. Ostali molekuli sa F, NO<sub>2</sub> i OCH<sub>3</sub> grupama ili nisu aktivni ili su manje aktivni od kontrolnih molekula.
- ❖ Simulacija molekulskog dokinga abiraterona, poznatog inhibitora ciljanog proteina (receptora) Citohroma P450 17A1, značajnog za tretman kancera prostate i dojke, i analiziranih stiril laktona pokazala je da sve strukture mogu da interaguju sa ovim enzimom. Jedinjenja sa visokom inhibitornom aktivnošću prema ćelijama kancera

prostate (PC3), imaju visok doking skor i mogu da grade koordinativno-kovalentnu vezu sa  $\text{Fe}^{2+}$  jonom prisutnim u aktivnom centru enzima. Jedinjenja koja su slabo ili potpuno neaktivna grade slabe interakcije sa enzimom i/ili se uopšte ne koordiniraju sa  $\text{Fe}^{2+}$  jonom.

- ❖ Visoka korelacija između eksperimentalnih i izračunatih vrednosti inhibitorne aktivnosti stiril laktona prema ćelijama kancera prostate, ukazuje na dobru predvidivost 3D-QSAR modela izvedenog metodom analiza komparativnih molekulskih polja CoMFA i CoMSIA. Dobijeni rezultati pokazali su da je karakteristika sternog polja na cinamoil grupi presudna za citotoksičnu aktivnost određenih stiril laktona. Da bi se predvidela inhibitorna aktivnost molekula, značajno je da se uključi njegova trodimenzionalna struktura kako bi se dobili pouzdaniji rezultati. Interakcije identifikovane iz 3D konturnih mapa su u dobroj korelaciji sa specifičnim interakcijama stiril laktona i amino kiselinskih ostataka proteina utvrđenim doking analizom i ukazuju na robusnost ustanovljenog 3D-QSAR modela.

*Sve navedeno ukazuje da pojedini stiril laktoni imaju određeni biološki potencijal i da bi se mogli koristiti kao antitumorski agensi nakon neophodnih dodatnih bioloških ispitivanja.*

## CONCLUSION

Based on the results and discussions regarding the performed analyses of styryl lactone, the following conclusions were drawn:

- ❖ The retention behaviour of compounds in the reverse phase chromatography was similar to the mobile phases of methanol-water and acetonitrile-water (pH 3.28), while in the case of acetonitrile, compounds had lower retention. The compounds acted in accordance with their polarity, i.e. the most polar compounds had the lowest retention, and the most hydrophobic compounds had the highest retention. The hydrophobic nature of the compounds and retention were increased by introducing the benzyl group, the cyclic ring and/or ester group of cinnamic acid into the molecules of the basic compounds.
- ❖ Stereoisomers (+)-goniofufurone and 7-*epi*-(+)-goniofufurone, as well as stereoisomers of crassalactones B and C had almost the same retention, which was not the case with stereoisomers of tricyclic lactones.
- ❖ The dependence of the compound retention on the volume fraction of methanol and acetonitrile in the mobile phase was linear, graph lines were parallel to each other, and therefore, the constants  $\log k_o$  and  $S$  of these functions could be used for their interpretation of the compound retention and for other correlations.
- ❖ The correlation of the chromatographic retention constants  $\log k_o$  and  $S$  with the *in silico* lipophilicity of the styryl lactones showed that these constants could be used as chromatographic lipophilicity parameters of the styryl lactones, particularly those determined by using the methanol-water mobile phase. Excluded from this analysis was a compound with two cinnamate groups, which generally had large values of *in silico* lipophilicity parameters.
- ❖ Using the hierarchical cluster analysis (based on constant  $\log k_o$ ) of the compounds, two well-defined clusters in both mobile phases were obtained, but the compounds were not grouped in the same way. This highlighted some differences in the behaviour

of the compounds in reverse phase chromatographic system.

- ❖ By clustering compounds based on *in silico* lipophilicity descriptors, two clusters were obtained as well – one containing compounds with high retention, high values of  $\log P$  and  $\log D$  and lower  $\log S$  values, and one containing compounds with low retention, low values of  $\log P$  and  $\log D$  and greater  $\log S$  values.
- ❖ *In silico* molecular descriptors were used to set up the appropriate quantitative correlation models between the structure and the retention constant  $\log k_o$ , i.e. QSRR models. The mixture of methanol-water proved to be the more mobile phase in this case as well. The best models were selected on the basis of statistical parameters of internal and external validations. Two parameters of the lipophilicity had their role in multiple linear regression models, which confirmed that lipophilicity was the main feature of the molecule in regard to chromatographic retention. Additionally, each of the correlations featured one ADME (*Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion*) descriptor.
- ❖ Very good correlations were gained between experimentally obtained and retention data  $\log k_o$  predicted using QSRR models. The determination coefficients  $R^2$  of linear regression models were above 0.8 and those of multiple regression models above 0.9. The predictive ability of the established QSRR models was such that it allowed calculating the lipophilicity of styryl lactones and similar compounds as well as predicting their chromatographic behaviour.
- ❖ On the basis of Lipinski's "Rule of 5", poor absorption was expected only in the case of dicinamate, a compound with molecular weight above 500 and lipophilicity parameter  $\text{Clog}P$  greater than 5. The values of chromatographic lipophilicity parameters  $\log k_o$  and  $S$  of other compounds were correlated to their *in silico* pharmacokinetic parameters: absorption constant ( $k_a$ ), volume of distribution ( $V_d$ ), effective jejunal permeability ( $P_{eff}$ ), fraction of the compound unbound in plasma ( $FUP$ ), plasma protein binding of molecule ( $PPB$ ), the logarithm of blood-brain barrier coefficient ( $\log BB$ ), human intestinal absorption ( $HIA$ ), the permeability of colon adenocancer cells ( $Caco-2$ ). All correlations, with the exception of  $\log BB$ ,  $HIA$ , and  $Caco-2$ , were linear and/or parabolic to the adjusted coefficient of determination  $R^2_{adj}$  for values above 0.7.
- ❖ The pharmacokinetic properties of styryl lactones were affected by different properties of molecules expressed by molecular descriptors: the lipophilicity of the molecule

affected  $k_a$ ,  $V_d$ ,  $FUP$ ,  $PPB$ ; the surface tension affected  $k_a$ ,  $V_d$ ,  $Pe_{eff}$ ; the number of rotatable bonds affected  $Pe_{eff}$ ,  $FUP$ ; the number of hydrogen bonding acceptors affected  $k_a$ ; the number of hydrogen bonding donors affected  $\log BB$ ; the number of aliphatic carbon atoms affected  $FUP$ ; geometric descriptors Dreiding energy and MMFF94 energy affected  $PPB$ .

- ❖ No significant correlations were obtained between the chromatographic lipophilic parameter  $\log k_o$  on one hand, and *in silico* pharmacological parameters of styryl lactone's GPCR ligands, ion channel modulators (*ICM*), nuclear receptors (*NRL*), inhibitors of kinases (*KI*), proteases (*PI*) and enzymes (*EI*) on the other.
- ❖ With the exception of dicinamate, all of the tested styryl lactones were inactive against single normal foetal lung fibroblasts (MRC-5) cell lines. The antiproliferative activity of the molecules was tested against four new human malignant cell lines: prostate cancer (PC3), colon cancer (HT-29), melanoma (Hs294T) and lung adenocarcinoma (A549). The most active newly synthesized compound was tricyclic 4-fluorocinnamic derivate that exhibited nanomolar activity ( $IC_{50}$  2.1 nM) against the melanoma cells (Hs294T) and was about 2250 times more active than the commercial antitumor agent doxorubicin (DOX). Additionally, several newly synthesized molecules also showed a higher activity than DOX, namely: 7*S*-methoxy and 7*S*-nitro derivatives crassalactone B against prostate cancer cells (PC3) and 7*S*- tricyclic cinnamoyl derivative against melanoma cells (Hs294T). DOX was less active than natural crassalactones B and C against prostate cancer cells (PC3) and lung adenocarcinoma cells (A549). Other active styryl lactones exhibited moderate to low cytotoxicity against malignant cells.
- ❖ When examining correlations between the structure and antiproliferative activity of the newly synthesized analog and basic styryl lactone molecules (SAR), the cytotoxicity was quantified by the difference in the common logarithmic  $IC_{50}$  values of the analog and the control molecule. The influence of molecular structure and configuration on the C-7 atom depended on the cell line. The introduction of an additional ring in a molecule of natural products did not increase the antiproliferative activity of the analogues. Crassalactones B and C and their synthetic analogs do not inhibit antiproliferation of melanoma cells, while crassalactone C and its derivatives are more active against lung adenocarcinoma cells. Replacing phenyl functional group with cinnamoyl functional group on 7*S* position affected the activity of molecules against prostate cancer cells, colon cancer and melanoma. Only in the case of tricyclic analogs

did the introduction of F group in *para* position of the benzene ring of the cinnamoyl residue significantly increase the activity of the molecules against prostate cancer cells and particularly melanoma cells. Other molecules with F, NO<sub>2</sub> and OCH<sub>3</sub> groups were either inactive or less active than the control molecules.

- ❖ Molecular docking simulation of abiraterone, a known inhibitor of the target protein (receptor) Cytochrome P450 17A1, and analysed styryl lactones showed that all structures could interact with this enzyme. Compounds with high inhibitory activity against prostate cancer cells (PC3) had high docking score and could form a coordinate covalent bond with Fe<sup>2+</sup> ion present at the active centre of the enzyme. Compounds that are weak or completely inactive had weak interaction with the enzyme and/or not form a coordinate covalent bond with Fe<sup>2+</sup> ion.
- ❖ Strong correlation between experimental and calculated values of the inhibitory activity of styryl lactones against prostate cancer cells indicates a good predictability of the 3D-QSAR model performed by comparative molecular field analysis methods CoMSIA and CoMFA. The results have shown that the characteristics of the steric fields in the cinnamoyl group are critical to the cytotoxic activity of certain styryl lactones. In order to predict the inhibitory activity of the molecule it is of utmost importance to include its three-dimensional structure so that more reliable results can be obtained. The interactions identified from the 3D contour maps were in good correlation with the specific interactions between styryl lactones and residues of amino acid in protein determined in the docking analysis and they indicate robustness of established 3D-QSAR model.

*The conclusions stated above indicate that some styryl lactones have a certain biological potential and that they could be used as antitumor agents after necessary additional biological tests.*

## 6. LITERATURA

- Abdulfatai, U., Uzairu, A., Uba, S. Quantitative structure-activity relationship and molecular docking studies of a series of quinazolinonyl analogues as inhibitors of gamma amino butyric acid aminotransferase. *Journal of Advanced Research*, 8 (2017) 33–43.
- Al-Haj, M.A., Kaliszan, R., Buszevski, B. Quantitative structure-retention relationships with model analytes as a means of an objective evaluation of chromatographic columns. *Journal of Chromatographic Science*, 39 (2001) 29–38.
- Almi, Z., Belaidi, S., Lanez, T., Tchouar, N. Structure activity relationship, QSAR modeling and drug-like calculations of TP inhibitor of 1,3,4-oxadiazoline-2-thione derivatives. *International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy*, 18 (2014) 113–122.
- Abdullah, N., Sahibul-Anwar, H., Ideris, S., Hasuda, T., Hitotsuyanagi, Y., Takeya, K., Diederich, M., Choo, C-Y. Gonilandrene A and B from *Goniothalamus macrophyllus*. *Fitoterapia*, 88 (2013) 1–6.
- Acharaya, C., Coop, A., Polli, J.E., Mackerell, A.D, Jr. Recent advances in ligand based drug design: relevance and utility of the conformationally sampled pharmacophore approach. *Current Compute-Aided Drug Design*, 7 (2011) 10–22.
- Ahmad, F.B., Nisa, N.K., Sallehuddin, M., Assim, Z. Chemical constituents and antiviral study of *Goniothalamus velutinus*. *Journal of Fundamental Science*, 6(1) (2010) 72–75.
- Al Momani, F., Alkofahi, A.S., Mhaidat, N.M., Altholactone displays promising antimicrobial Activity. *Molecules*, 16 (2011) 4560–4566.
- Arnott, J.A., Planey, S.L. The influence of lipophilicity in drug discovery and design. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 7 (2012) 863–875.
- Aslam, M.S., Ahmad, M.S., Mamat, A.S. Ahmad, M.Z., Salam, F. *Goniothalamus*: Phytochemical and ethnobotanical Review. *Recent Advances in Biology and Medicine*, 2 (2016) 34–37.
- Andrić, F., Hérberger, K. Chromatographic and computational assessment of lipophilicity using sum of ranking differences and generalized pair-correlation. *Journal of Chromatography A*, 1380 (2015a) 130–138.
- Andrić, F., Hérberger, K. Towards better understanding of lipophilicity: assessment of *in silico* and chromatographic logP measures for pharmaceutically important compounds by nonparametric rankings. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 115 (2015b) 183–191.
- Ayouni, A., Cazorla, G., Chaillou, D., Herbreteau, B., Rudaz, S., Lantéri, P., et al. Fast determination of lipophilicity by HPLC. *Chromatographia*, 62 (2005) 251–255.
- Barcelos, R.C., Pastre, J.C., Caixeta, V., Vendramini-Costa, D.B., de Carvalho, J.E., Pilli, R.A. Synthesis of methoxylated goniothalamine, aza-goniothalamine and  $\gamma$ -pyrones and their *in vitro* evaluation against human cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20 (2012) 3635–3651.

- Barcelos, R.C., Pastre, J.C., Vendramini-Costa, D.B., Caixeta, V., Longato, G.B., Monteiro, P.A., de Carvalho, J.E., Pilli, R.A. Design and synthesis of N-acylated aza-goniothalamine derivatives and evaluation of their in vitro and in vivo antitumor activity. *ChemMedChem*, 9 (2014) 2725–2743.
- Barros, M.E.S.B., Freitas, J.C.R., Oliveira, J.M., da Cruz, C.H.B., da Silva, P.B.N., de Araújo, Militão, G.C.G., da Silva, T.G., Oliveira, R.A., Menezes, P.H. Synthesis and evaluation of (-)-Massoialactone and analogues as potential anticancer and anti-inflammatory agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 76 (2014) 291–300.
- Beena, T., Sudha, L., Nataraj, A., Balachandran, V., Kannan, D., Ponnuswamy, M.N. Synthesis, spectroscopic, dielectric, molecular docking and DFT studies of (3E)-3-(4-methylbenzylidene)-3,4-dihydro-2H-chromen-2-one: as anticancer agent. *Chemistry Central Journal*, 11(2017) 1–19.
- Benedeković, G., Francuz, J., Kovačević, I., Popsavin, M., Srećo Zelenović, B., Kojić, V., Bogdanović, G., Divjaković, V. Popsavin, V. Conformationally constrained goniofufurone mimics as inhibitors of tumour cells growth: Design, synthesis and SAR study. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 82 (2014a) 449–458.
- Benedeković, G., Francuz, J., Kovačević, I., Popsavin, M., Srećo Zelenović, B., Kojić, V., Bogdanović, G., Divjaković, V. Popsavin, V. Design, synthesis and SAR analysis of antitumour styryl lactones related to (+)-crassalactones B and C. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 87 (2014b) 237–247.
- Benedeković, G., Kovačević, I., Popsavin, M., Francuz, J., Kojić, V., Bogdanović, G., Popsavin, V. Divergent total synthesis of crassalactones B and C and evaluation of their antiproliferative activity. *Tetrahedron*, 71 (2015) 4581–4589.
- Bergström, C.A.S., Charman, W.N., Porter, C.J.H. Computational prediction of formulation strategies for beyond-rule-of-5 compounds. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 101 (2016) 6–21.
- Bermejo, A., Léonce, S., Cabedo, N., Andreu, I., Caignard, D.H., Atassi, G., Cortes, D. Semisynthesis and cytotoxicity of styryl-lactone derivatives. *Journal of Natural Products*, 62(8) (1999) 1106–1109.
- Blázquez, M.A., Bermejo, A., Zafra-Polo, M.C., Cortes, D. Styryl-lactones from Goniothalamus species-A\review. *Phytochemical Analysis*, 10 (1999) 161–170.
- Boonmuen, N., Thongon, N., Chairoungdua, A., Suksen, K., Pompimon, W., Tuchinda, P., Reutrakul, V., Piyachaturawat, P. 5-Acetyl goniothalamine suppresses proliferation of breast cancer cells via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *European Journal of Pharmacology*, 791 (2016) 455–464.
- Bruno, R.D., Gover, T.D., Burger, A.M., Brodie, A.M., Njar, V.C. 17 $\alpha$ -Hydroxylase/17,20 lyase inhibitor VN/124-1 inhibits growth of androgen-independent prostate cancer cells via induction of the endoplasmic reticulum stress response. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7 (2008) 2828–2836.
- Bush, B.L., Nachbar, R.B. Sample-distance partial least squares: PLS optimized for many variables, with application to CoMFA. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 7 (1993) 587–619.
- Can, A. Quantitative structure-toxicity relationship (QSTR) studies on the organophosphate insecticides. *Toxicology Letters*, 230 (2014) 434–443.



- Carpenter, T.S., Kirshner, D.A., Lau, E.Y., Wong, S.E., Nilmeier, N.P., Lightstone, F.C. A method to predict blood-brain barrier permeability of drug-like compounds using molecular dynamics simulations. *Biophysical Journal*, 107 (2014) 630–641.
- Cecchelli, R., Berezowski, S., Lundquist, S., Culot, M., Renftel, M., Dehouck, M.P., Fenart, I. Modeling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6 (2007) 650–661.
- ChemBioOfficem 2012. Perkin Elmer Informatics <<http://www.cambridgesoft.com/>>.
- ChemAxon, Ltd. <<http://www.chemaxon.com/>>.
- Cirera-Domènech, E., Estrada-Tejedor, R., Broto-Puig, F., Teixidó, J., Gassiot-Matas, M., Comellas, L., Lliberia, J.L., Méndez, A., Paz-Estivill, S., Delgado-Ortiz, M.R. Quantitative structure-retention relationships applied to liquid chromatography gradient elution method for the determination of carbonyl-2,4-dinitrophenylhydrazones compounds. *Journal of Chromatography A*, 1276 (2013) 65–77.
- Chiro, N., Gramatica, P. Real external predictivity of QSAR models: How to evaluate it? Comparison of different validation criteria and proposal of using the concordance correlation coefficient. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 51 (2011) 2320–2335.
- Chiro, N., Gramatica, P. Real external predictivity of QSAR models. Part 2. New intercomparable thresholds for different validation criteria and the need for scatter plot inspection. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 52 (2012) 2044–2058.
- Choo, C-Y., Abdullah, N., Diederich, M. Cytotoxic activity and mechanism of action of metabolites from the *Goniothalamus* genus. *Phytochemical Review*, (2014) 1–17. [springer.com/article/10.1007/s11101-014-9372-2](http://springer.com/article/10.1007/s11101-014-9372-2). (27.12.2015).
- Cirera-Domènech, E., Estrada-Tejedor, R., Broto-Puig, F., Teixidó, J., Gassiot-Matas, M., Comellas, L., Lliberia, J.L., Méndez, A., Paz-Estivill, S., Delgado-Ortiz, M.R. Quantitative structure-retention relationships applied to liquid chromatography gradient elution method for the determination of carbonyl-2,4-dinitrophenylhydrazones compounds. *Journal of Chromatography A*, 1276 (2013) 65–77.
- Clark, D. E. In silico prediction of blood-brain barrier permeation. *Drug Discovery Today*, 8 (2003) 927–933.
- Cramer, R.D., Patterson, D.E., Bunce, J.D., Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 110 (1988) 5959–5967.
- Cramer, R.D. The inevitable QSAR renaissance. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 26(1) (2012) 35–38.
- Colmenarejo, G., Alvarez-Pedraglio, A., Lavandera, J.L. Chemoinformatic models to predict binding affinities to human serum albumin. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44 (2001) 4370–4378.
- Csermely, T., Kalász, H., Deáak, K., Hasan, M.Y., Darvas, F., Petroianu, G. Lipophilicity determination of some ACE inhibitors by TLC. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 31 (2008) 2019–2034.
- Dabrowska, M., Starek, M., Skuciński, J. Lipophilicity study of some non-steroidal anti-inflammatory agents and cephalosporin antibiotics: A review. *Talanta*, 86 (2011) 35–51.

- De, P., Baltas, M., Bedos-Belval, F. Cinnamic acid derivatives as anticancer agents – A Review. *Current Medicinal Chemistry*, 18 (2011) 1672–1703.
- Dearden, J.C. Applications of quantitative structure-property relationships to pharmaceuticals (Review). *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 24 (1994) 77–87.
- de Fátima, A., Modolo, L.V., Conejero, L.S., Pilli, R.A., Ferreira, C.V., Kohn, L.K., de Carvalho, J.E. Styryl lactones and their derivatives: biological activities, mechanisms of action and potential leads for drug design. *Current Medicinal Chemistry*, 13 (2006) 3371–3384.
- Dehmer, M., Varmuza, K., Bonchev, D. (Eds.). Statistical modelling of molecular descriptors in QSA/QSPR. Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2012.
- del Amo, E.M., Ghemtio, L., Xhaard, H., Yliperttula, M., Urtti, A., Kidron, H. Applying linear and non-linear methods for parallel prediction of volume of distribution and fraction of unbound drug. *PLOS ONE*, 8 (2013) 1–7.
- DeVore, N.M., Scott, E.E. Cytochrome P450 17A1 structures with prostate cancer drugs abiraterone and TOK-001. *Nature*, 482 (2012) 116–119.
- Djaković-Sekulić, T.Lj., Sârbu, C., Perišić-Janjić, N.U. A comparative study of the lipophilicity of benzimidazole and benzotriazole derivatives by RPTLC. *Journal of Planar Chromatography –Modern TLC*, 18 (2005) 432–436.
- Didaoui, L., Touabet, A., Badjah Hadj Ahmed, A.Y., Meklati, B.Y. Evaluation of dead time calculation in reversed-phase liquid chromatography using a multiparametric mathematical method. *Journal of High Resolution Chromatography*, 22 (1999) 559–564.
- Doan, K.M.M., Humphreys, J.E., Webster, L.O., Wring, S.A., Shampine, L.J., Serabjit-Singh, C.J., Adkison, K.K., Polli, J.W. Passive permeability and P-glycoprotein-mediated efflux differentiate central nervous system (CNS) and non-CNS marketed drugs. *Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics*, 303 (2002) 1029–1087.
- Drug design - Wikipedia, the free encyclopedia. URL [http://en.wikipedia.org/wiki/Drug\\_design](http://en.wikipedia.org/wiki/Drug_design)
- Duc, L.V., Thanh, T.B., Thanh, H.N., Tien, V.N. Chemical constituents and cytotoxic effect from the barks of *Goniothalamus chinensis* Merr. & Chun. Growing in Vietnam. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6 (2016) 1–5.
- Dudek, A., Arodz, T., Gálvez, J. Computational methods in developing quantitative structure-activity relationships (QSAR): A review. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 9 (2006) 213–228.
- El-Zayat, A.E., Ferrigni, N.R., McCloud, T.G., McKenzie, A.T., Byrn, S.R., Cassady, J.M., Chang, C.J., McLaughlin, J.L. Goniothalenol: a novel bioactive, tetrahydrofurano-2-pyrone from *Goniothalamus giganteus* (Annonaceae). *Tetrahedron Letters*, 26 (1985) 955–956.
- Erum, I., Kamariah, A.S., Abddalla, J.M., Linda, L.B.L., Nur-Nazurah A. Antimicrobial, anticancer, and cytotoxicity activities of a crude methanolic extract from the bark of *Goniothalamus velutinus* (Airy Shaw) Collected from Brunei Darussalam. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 8 (2016) 95–103.
- Fang, X.P., Anderson, J.E., Chang, C.J., McLaughlin, J.L., Fanwick, P.E. Novel bioactive styryl lactones: goniofufurone, goniopyrpyrone, and 8-acetylgoniotriol from *Goniothalamus giganteus* (Annonaceae). X-ray molecular structure of goniofufurone and of goniopyrpyrone.. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*, 1 (1990) 1655–1661.

- Fang, X.P., Anderson, J.E., Chang, C.J., McLaughlin, J.L., Fanwick, P.E. Two new styryl lactones, 9-deoxygoniopypyrone and 7-*epi*-goniofufurone, from *Goniothalamus giganteus* (Annonaceae). *Journal of Natural Products*, 54 (1991a) 1034–1043.
- Fang, X.P., Anderson, J.E., Chang, C.J., McLaughlin, J.L. Three new bioactive styryl lactones from *Goniothalamus giganteus* (Annonaceae). *Tetrahedron*, 47 (1991b) 9751–9758.
- Fang, X.P., Anderson, J.E., Qui, X.X., Kozlowski, J.F., Chang, C.J., McLaughlin, J.L. Gonioheptolides A and B: novel eight-membered ring lactones from *Goniothalamus giganteus* (Annonaceae). *Tetrahedron*, 49 (1993) 1563–1570.
- Fattori, D. Molecular recognition: the fragment approach in lead generation. *Drug Discovery Today*, 9 (2004) 229–238.
- Farkas, O., Jakus, J., Héberger, K. Quantitative structure-antioxidant activity relationship of flavonoid compounds. *Molecules*, 9 (2004) 1079–1088.
- Ferreira, L.G., dos Santos, R.N., Oliva, G., Andricopulo, A.D. Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules*, 20 (2015) 13384–13421.
- Francuz, J., Srećo, B., Popsavin, M., Benedeković, G., Divjaković, V., Kojić, V., Bogdanović, G., Kapor, A., Popsavin, V. Novel goniofufurone and 7-*epi*-goniofufurone mimics from unexpected titanium-mediated displacement process. *Tetrahedron Letters*, 53 (2012) 1819–1822.
- Francuz, J., Kovačević, I., Popsavin, M., Benedeković, G., Srećo Zelenović, B., Kojić, V., Jakimov, D., Aleksić, L., Bogdanović, G., Srdić-Rajić, T., Lončar, E., Rodić, M.V., Divjaković, V., Popsavin, V. Design, synthesis and in vitro antitumour activity of new goniofufurone and 7-*epi*-goniofufurone mimics with halogen or azido groups at the C-7 position. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 128 (2017) 13–24.
- Freitas, A.A., Limbu, K., Ghafourian, T. Predicting volume of distribution with decision tree-based regression methods using predicted tissue:plasma partition coefficients. *Journal of Cheminformatics*, 7 (2015) 1–17.
- Ghafourian, T., Barzegar-Jalali, M., Dastmalchi, S., Khavari-Khorasani, T., Hakimiha, N., Nokhodchi, A. QSPR models for the prediction of apparent volume of distribution. *International Journal of Pharmaceutical*, 319 (2006) 82–97.
- Ghafourian, T., Amin, Z. QSAR models for the prediction of plasma protein binding. *BioImpacts*, 3 (2013) 21–27.
- Ghasemi, J., Saaidpour, S. QSRR prediction of the chromatographic retention behavior of painkiller drugs. *Journal of Chromatographic Science*, 47 (2009) 156–163.
- Giaginis, C., Tsantili-Kakoulidou, A. Current state of the art in HPLC methodology for lipophilicity assessment of basic drugs. A review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 31 (2007) 79–96.
- Gocan, S., Cimpan, G., Comer, J. Lipophilicity measurements by liquid chromatography. *Advance in Chromatography*, 44 (2006) 79–176.
- Golbraikh, A., Tropsha, A. Predictive QSAR modeling based on diversity sampling of experimental dataset for the training and test set selection. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 16 (2002a) 375–369.
- Golbraikh, A., Tropsha, A. Beware of  $q^2$ !. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 20 (2002b) 269–276.

- Goryński, K., Bojko, B., Nowaczyk, A., Buciński, A., Pawliszyn, J., Kaliszan, R. Quantitative structure-retention relationship models for prediction of high performance liquid chromatography retention time of small molecules: Endogenous metabolites and banned compounds. *Analytica Chimica Acta*, 797 (2013) 13–19.
- Gramatica, P., Sangion, A. A historical excursus on the statistical validation parameters for QSAR models: A clarification concerning metrics and terminology, *Journal of Chemical Information and Modeling*, 56 (2016) 1127–1131.
- Guillot, A., Henchoz, Y., Moccand, C., Guillarme, D., Veuthey, J.-L., Carrupt, P.-A., Martel, S. Lipophilicity determination of highly lipophilic compounds by liquid chromatography. *Chemistry & Biodiversity*, 6 (2009) 1828–1836.
- Halgren, T.A. Merck molecular force field. II. MMFF94 vander Waals and electrostatic parameters for intermolecular interactions. *Journal of Computational Chemistry*, 17 (1996) 520–552.
- Hanai, T. Quantitative in silico analysis of organic modifier effect on retention in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of chromatographic Science*, 52 (2014) 75–80.
- Hansch, C., Fujita, T.  $p$ - $\sigma$ - $\pi$  Analysis. A method for the correlation of biological activity and chemical structure. *Journal of the American Chemical Society*, 86 (1964) 1616–1626.
- Hansch, C. A quantitative approach to biochemical structure-activity relationships. *Accounts of Chemical Research*, 2 (1969) 232–239.
- Haq, Z-U., Wadood, A., Uddin, R. CoMFA and CoMSIA 3D-QSAR analysis on hydroxamic acid derivatives as urease inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 24 (2009) 272–278.
- Harnisch, M., Möckel, H.J., Schulze, G. Relationship between  $\log P_{o/w}$ , shake-flask values and capacity factors derived from reversed-phase high-performance liquid chromatography for n-alkylbenzenes and some OECD reference substances. *Journal of Chromatography A*, 282 (1983) 315–332.
- Héberger, K. Quantitative structure – (chromatographic) retention relationships. *Journal of Chromatography A*, 1158 (2007) 273–305.
- Henchoz, Y., Guillarme, D., Rudaz, S., Veuthey, J.-L., Carrupt, P.-A. High-throughput  $\log P$  determination by ultraperformance liquid chromatography: a convenient tool for medicinal chemists. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51 (2008) 396–399.
- Herlina, T., Mardianingrum, R., Gaffar, S., Supratman, U. Isoquinoline Alkaloids from *Erythrina poeppigiana* (Leguminosae) and cytotoxic activity against breast cancer cells line MCF-7 in silico. *Journal of Physics: Conference Series*, 812 (2017) 1–5.
- Hidalgo, I.J., Hilgreen, K.M., Grass, G.M., Borchardt, R.T. Characterization of the unstirred water layer in Caco-2 cell monolayers using a novel diffusion apparatus. *Pharmaceutical Research*, 8 (1991) 222–227.
- Hintze J., NCSS 2007, NCSS, LLC, Kaysville, Utah, USA <<http://www.ncss.com>>. (4.09.2016.)
- Hopfinger, A.J., Wang, S., Tokarski, J.S., Jin, B., Albuquerque, M., Madhav, P.J., Duraiswami, C. Construction of 3D-QSAR Models Using the 4D-QSAR Analysis Formalism. *Journal of the American Chemical Society*, 119 (1997) 10509–10524.

- Hosamani, S.M., Kulkarni, B.B., Boli, R.G., Gadag, V.M. QSPR analysis of certain graph theoretical matrices and their corresponding energy. *Applied Mathematics and Nonlinear Sciences*, 2 (2017) 131–150.
- Hou, T.J., Xu, X.J. ADME evaluation in drug discovery. Modeling blood-brain barrier partitioning using simple molecular descriptors. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 43 (2003) 2137–2152.
- Hou, T.J., Wang, J.M., Zhang, W., Hu, X. Recent advances in computational prediction of drug absorption and permeability in drug discovery. *Current Medicinal Chemistry*, 13 (2006) 2653–2667.
- Huang, S.Y., Zou, X. Advances and challenges in protein-ligand docking. *International Journal of Molecular Sciences*, 11 (2010) 3016–3034.
- I-Lab 2.0 (ACD/Labs online program, <https://ilab.acdlabs.com/iLab2/>) (20.06.2016)
- Iqbal, E., Salim, K.A., Lim, L.B.L. Phytochemical screening, total phenolics and antioxidant activities of bark and leaf extracts of *Goniiothalamus velutinus* (Airy Shaw) from Brunei Darussalam. *Journal of King Saud University – Science*, 27 (2015) 224–232.
- Irvine, J.D., Takahashi, L., Lockhart, K., Cheong, J., Točan, J.W., Selick, H.E., Russel Grove, J. MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) Cells: A Tool for Membrane Permeability Screening. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88 (1999) 28–33.
- IUPAC, Compendium of Chemical Terminology, 2nd edn. (the „Gold Book“). PAC 69, 1137 (1997). Glossary of terms used in computational drug design (IUPAC Recommendations).
- Jain, A.N. Surfleks: fully automatic flexible molecular docking using a molecular similarity-based search engine. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46 (2003) 499–511.
- Jevrić, L.R., Karadžić, M.Ž., Mandić, A.I., Nikolić, A.R., Okljeđa, A.M., Sakač, M.N., Penov-Gaši, K.M., Stojanović, S.Z. Lipophylicity estimation and characterization of selected steroid derivatives of biomedical importance applying RP HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 134 (2017) 27–35.
- Jevrić, L.R., Podunavac-Kuzmanović, S.O., Kovačević, S.Z., Kalajdžija, N.D., Jovanović, B.T., Estimation of the retention behaviour of s-triazine derivatives applying multiple regression analysis of selected molecular descriptors. *Acta Periodica Technologica*, 44 (2013) 229–237.
- Jewers, K., Davis, J.B., Dougan, J., Manchanda, A.H., Blunden, G., Kyi, G., Wetchapinan, S. Goniotalamin and its distribution in four *Goniiothalamus* species. *Phytochemistry*, 11 (1972) 2025–2030.
- Jitender, K.M., Himesh, S., Singhai, A.K., Harish, P. QSAR – Application in drug design. *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Science*, 2 (2013) 1–13.
- Johnson, M., Maggiora, G.M. *Concepts and Applications of Molecular Similarity*. John Wiley, New York, USA, 1990.
- Kaliszan, R. Quantitative structure-chromatographic retention relationships, Wiley, New York, 1987.
- Kaliszan, R. Structure and retention in chromatography-A Chemometric Approach, Harwood, Amsterdam, 1997.

- Kaliszan, R. Recent advanced in quantitative structure –retention relationships (QSRR). In Valkó, K. (ed). *Separation Methods in Drug Synthesis and Purification* (1st Edition), Elsevier, Amsterdam, 2000, 503–534.
- Kaliszan, R. QSRR: Quantitative structure – (chromatographic) retention relationships. *Chemical Reviews*, 107 (2007) 3212–3246.
- Kapetanovic, I.M. Computer-aided drug discovery and development (CADD): *In silico*-chemico-biological approach. *Chemico-Biological Interaction*, 171 (2008) 165–176.
- Karadžić, M.Ž., Jevrić, L.R., Podunavac-Kuzmanović, S.O., Lončar, E.S. Kovačević, S.Z. Structure-retention relationship study of 2,4-dioxotetrahydro-1,3-thiazole derivatives. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 38 (2015) 1247–1253.
- Karadžić, M.Ž., Lončar, D.M., Benedeković, G., Kovačević, I., Popsavin, V., Kovačević, S.Z., Jevrić, L.R., Podunavac-Kuzmanović, S.O. A comparative study of chromatographic behavior and lipophilicity of selected natural styryl lactones, their derivatives and analogues. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105 (2017) 99–107.
- Karelson, M., Lobanov, V.S., Katritzky, A.R. Quantum-chemical descriptors in QSAR/QSPR studies. *Chemical Reviews*, 96 (1996) 1027–1044.
- Kawczak, P., Bober, L., Baczek, T. QSPR analysis of some agonists and antagonists of  $\alpha$ -adrenergic receptors. *Medicinal Chemistry Research*, 24 (2015) 372–382.
- Kerns, E.H., Di, L. Drug-like properties: Concepts, structure, design and methods: from ADME to toxicity optimization. Elsevier Inc., Amsterdam, 2008.
- Kharkar, P.S. Two-Dimensional (2D) *in silico* models for absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME/T) in drug discovery. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 10 (2010) 116–126.
- Klebe, G., Abraham, U., Mietzner, T. Molecular similarity indices analysis in comparative analysis (CoMSIA) of drug molecules to correlate and predict their biological activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 37 (1994) 4130–4146.
- Klebe, G., Abraham, U. Comparative molecular similarity index analysis (CoMSIA) to study hydrogen-bonding properties and to score combinatorial libraries. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 13 (1999) 1–10.
- Konsam, S.C., Ningthoujam, S.S. Potsangbam, K.S. Antibacterial activity and phytochemical screening of *Goniothalamus sesquipedalis* (Wall) Hook. f. & Thomson extracts from Manipur, North east India. *European Journal of Medicinal Plants*, 8 (2015) 142–148.
- Kovačević, I., Popsavin, M., Benedeković, G., Kojić, V., Jakimov, D., Srdić-Rajić, T., Bogdanović, G., Divjaković, V., Popsavin, V. Synthesis and antiproliferative activity of goniobutenolides A and B, 5-halogenated crassalactone D derivatives and the corresponding 7-epimers. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 108 (2016) 594–604.
- Kovačević, I., Popsavin, M., Benedeković, G., Kesić, J., Kojić, V., Jakimov, D., Srdić-Rajić, T., Bogdanović, G., Divjaković, V., Popsavin, V. Synthesis and in vitro antitumour activity of crassalactone D, its stereoisomers and novel cinnamic ester derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 134 (2017) 293–303.
- Kovačević, S.Z., Jevrić, L.R., Podunavac-Kuzmanović, S.O., Lončar, E.S. Chemometric estimation of RP TLC retention behavior of some estrane derivatives by using multivariate regression analysis. *Central European Journal of Chemistry*, 11 (2013) 2031–2039.

- Kovačević, S.Z., Podunavac-Kuzmanović, S.O., Jevrić, L.R., Lončar, E.S. Assessment of chromatographic lipophilicity of some anhydro-D-aldose derivatives on different stationary phases by QSRR approach. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 38 (2015) 492–500.
- Kovačević, S.Z., Podunavac-Kuzmanović, S.O., Jevrić, L.R., Jovanov, P.T., Djurendić, E.A., Ajduković, J.J. Comparative QSAR modeling as a starting point in characterization and further development of anticancer drugs based on 17 $\alpha$ -picolyl and 17 $\epsilon$ -picolinylidene androstane structures. *European Journal of Pharmaceutical Science*, 93 (2016) 1–10.
- Kratochwil, N.A., Huber, W., Müller, F., Kansy, M., Gerber, P.R. Predicting plasma-protein binding of drugs: a new approach. *Biochemical Pharmacology*, 64 (2002) 1355–1374.
- Kujawski, J., Popielarska, H., Myka, A., Drabińska, B., Bernard, M.K. The logP parameter as a molecular descriptor in the computer-aided drug design—an overview. *Computational Methods in Science and Technology*, 18 (2012) 81–88.
- Kwon, G.H., Cho, S., Lee, J., Sohn, J.M., Byun, J.S., Lee, K-T., Lee, J.Y. CoMSIA 3D-QSAR analysis of 3,4-dihydroquinazoline derivatives against human colon cancer HT-29 Cells. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 35 (2014) 3181–3187.
- Láznicek, M., Láznickova, A. The effect of lipophilicity on protein binding and blood cell uptake of some acidic drugs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 13 (1995) 823–828.
- Leahy, D.E., Taylor, P.J., Wait, A.R., Model solvent system for QSAR Part I. Propylene glycol dipelargonate (PGDP). A new standard solvent for use in partition coefficient determination. *Quantitative Structure-Activity Relationship*, 8 (1989) 17–31.
- Lemke, T.L. Review of organic functional groups: Introduction to medicinal organic chemistry. Lippincott. Williams & Wilkins. Philadelphia, 2003.
- Lekphrom, R., Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K. Bioactive styryllactone and alkaloid from flowers *G. Laoticus*. *Journal of Natural Products*, 125 (2009) 47–50.
- Liang, C., Lian, H. Recent advances in lipophilicity measurement by reversed-phase high-performance liquid chromatography, TrAC Trends. *Analytical Chemistry*, 68 (2015) 28–36.
- Linnankoski, J., Makela, J.M., Ranta, V.P., Urtti, A., Ylipertulla, M. Computational prediction of oral drug absorption based on absorption rate constants in humans. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49 (2006) 3674–3681.
- Linnankoski, J., Ranta, V.P., Ylipertulla, M., Urtti, A., Passive oral drug absorption can be predicted more reliably by experimental than computational models—Fact or myth. absorption rate constants in humans. *European Journal of Pharmaceutical Science*, 34 (2008) 129–139.
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46 (2001) 3–26.
- Liu, R., Sun, H., So, S-S. Development of quantitative structure-property relationship models for early ADME evaluation in drug discovery. 2. Blood-brain barrier penetration. *Journal of Chemical Information and Computer Science*, 41 (2001) 1623–1632.
- Liu, P., Long, W. Current Mathematical Methods Used in QSAR/QSPR studies. Review. *International Journal of Molecular Science*, 10 (2009) 1978–1998.

- Liu, J., Zhang, H., Xiao, Z., Wang, F., Wang, X., Wang, Y. Combined 3D-QSAR, molecular docking and molecular dynamics study on derivatives of peptide epoxyketone and tyropeptin-boronic acid as inhibitors against the  $\beta 5$  submit of human 20S Proteasome. *International Journal of Molecular Sciences*, 12 (2011) 1807–1835.
- Lombardo, F., Shalaeva, M.Y., Tupper, K.A., Gao, F., Abraham, M.H. A tool for lipophilicity determination in drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43 (2000) 2922–2928.
- Lombardo, F., Shalaeva, M.Y., Tupper, K.A., Gao, F. A tool for lipophilicity determination in drug discovery. 2. Basic and neutral compounds. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44 (2001) 2490–2497.
- Lopez-Grio, S., Garcia-Alvarez-coque, M.C., Hinze, W.L., Quina, F.H., Berthod, A. Effect of a variety of organic additives on retention and efficiency in micellar liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, 72 (2000) 4826–4835.
- López-Vallejo, E., Caulfield, T., Martinez-Mayorga, K., Giulianotti, M.A., Houghten, R.A., Nefzi, A., Medina-Franco, J.L. Integrating virtual screening and combinatorial chemistry for accelerated drug discovery. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 14 (2011) 475–487.
- Louis, B., Agrawal, V.K. Quantitative structure-pharmacokinetic relationship (QSPkR) analysis of the volume of distribution values of anti-infective agents from J group of the ATC classification in humans. *Acta Pharmaceutica*, 62 (2012) 305–323.
- Macabeo, A.P.G., Lopez, A.D.A., Schmidt, S., Heilmann, J., Dahse, H-M., Alejandro, G.J.D., Franzblau, S.G. Antitubercular and cytotoxic constituents from *Goniiothalamus gitingensis*. *Records of Natural products*, 8 (2013) 41–45.
- Mannhold, R., Poda, G.I., Ostermann, C., Tetko, I.V. Calculation of molecular lipophilicity. State-of-the-art and comparison pf logP methods on more than 96000 compounds. *Journal of Pharmaceutical Science*, 98 (2009) 861–893.
- Marciniec, K., Bafeltowska, J., Maślankiewicz, M.J., Buszman, E., Boryczka, S. Determination of lipophilicity of quinolinesulfonamides by reversed-phase HPLC and theoretical calculations. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 39 (2016) 702–709.
- Martel, S., Begnaud, F., Schuler, W., Gillert, F., Oberhauser, N., Nurisso, A., Carrupt, P-A. Limits and rapid logP determination methods for highly lipophilic and flexible compounds. *Analytica Chimica Acta*, 915 (2016) 90–101.
- MarvinSketch 15.3.26 (ChemAxon)
- Masand, V.B., Mahajan, D.T., Hadda, T.B., Jawarkar, R.D., Chavan, H., Bandgar, B.P., Chauhan, H. Molecular docking and quantitative structure-activity relationship (QSAR) analyses of indolylarylsulfones as HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Medicinal Chemistry Research*, 23 (2014) 417–425.
- Matsson, P., Doak, B.C., Over, B., Kihlberg, J. Cell permeability beyond the rule of 5. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 101 (2016) 42–61.
- Mayer, J.M., van der Warerbeemd, H. Development of quantitative structure-pharmacokinetic relationship. *Environmental Health Perspectives*, 61 (1985) 295–306.
- Mazák, K., Vámos, J., Nemes, A., Rácz, Á., Noszál, B. Lipophilicity of vinpocetine and related compounds characterized by reversed-phase thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 996 (2003) 195–203.



- Meng, X.Y., Zhang, H-X., Mezei, M., Cui, M. Molecular docking: A powerful approach for structure-based discovery. *Current Computer-Aided Drug Design*, 7 (2011) 146–157.
- Mereyala, H.B., Gadikota, R.R., Joe, M., Arora, S.K., Dastidar, S.G., Agarwal, S. Synthesis and antitumor activity of goniofufurone analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 7 (1999) 2095–2103.
- Milošević, N.P., Dimova, V.B., Perišić-Janjić, N.U. RP TLC data in correlation studies with *in silico* pharmacokinetic properties of benzimidazole and benztriazole derivatives. *European Journal of Pharmaceutical Science*, 49 (2013) 10–17.
- Milošević, N., Janjić, N., Milić, N., Milanović, M., Popović, J., Antonović, D. Pharmacokinetics and toxicity predictors of new s triazines, herbicide candidates, in correlation with chromatographic retention constants. *Agricultural and Food Chemistry*, 62 (2014a) 8579–8565.
- Milošević, N.P., Stojanović, S.Z., Penov-Gaši, K., Perišić-Janjić, N., Kaliszan, R. Reversed- and normal-phase liquid chromatography in quantitative structure retention-property relationships of newly synthesized seco-androstene derivatives. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 88 (2014b) 636–642.
- Minovski, N., Jezierska-Mazzarello, A., Vračko, M., Šolmajer, T. Investigation of 6-fluoroquinolones activity against Mycobacterium tuberculosis using theoretical molecular descriptors: a case study. *Central European Journal of Chemistry*, 9 (2011) 855–866.
- Mohideen, M., Zulkepli, S., Nik-Salleh, N-S., Zulkepli, Zulkefeli, M., Weber, J-F.F.A., Rahman, A.F.M.M. Design, synthesis, in vitro cytotoxicity evaluation and structure-activity relationship of goniothalamine analogs. *Archives of Pharmacological Research*, 36 (2013) 812–831.
- Molinspiration Cheminformatics <<http://www.molinspiration.com/>>. (13.10.2016)
- Muehlbacher, M., Spitzer, G.M., Liedl, K.R. Qualitative prediction of blood–brain barrier permeability on a large and refined dataset. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 25 (2011) 1095–1106.
- Murugan, R., Grendze, M.P., Toomey, J.E., Katrizky, A.R., Karelson, M., Lobanov, V., Rachwal, P. Predicting physical properties from molecular structure. *Chemtech*, 24 (1994) 17–23.
- Narayan Das, R., Roy, K. Computation of chromatographic lipophilicity parameter  $\log k_o$  of ionic liquid cations from „ETA“ descriptors: application in modeling of toxicity of ionic liquids to pathogenic bacteria. *Journal of Molecular Liquids*, 216 (2016) 754–763.
- Nasal, A., Siluk, D., Kaliszan, R. Chromatographic retention parameters in medicinal chemistry and molecular pharmacology. *Current Medicinal Chemistry*, 10 (2003) 381–426.
- Nava-Ocampo, A.A., Bello-Ramirez, A.M. Lipophilicity affects the pharmacokinetics and toxicity of local anaesthetic agents administered by caudal block. *Clinical Experimental Pharmacology*, 31 (2004) 116–118.
- Noorizadeh, H., Noorizadeh, M., Farmany, A. Advanced QSRR models of toxicological screening of basic drugs in whole blood by UPLC-TOF-MS. *Medicinal Chemistry Research*, 21 (2012) 4357–4368.
- O’Boyle, N.M., Banck, M., James, C.A., Morley, C., Vandermeersch, T., Hutchison, G.R. Open Babel: an open chemical toolbox. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 3 (2011) 1–14.

- Obringer, O., Manwaring, J., Goebel, C., Hewitt, N.J., Rothe, H. Suitability of the in vitro Caco-2 assay to predict the oral absorption of aromatic amine hair dyes. *Toxicology in Vitro*, 32 (2016) 1–7.
- O'Brien, R. M. A caution regarding rules of thumb for variance inflation factor, *Quality & Quantity*, 41 (2007) 673–690.
- Olivares-Morales, A., Lennernäs, H., Aarons, L., Rostami-Hodjegan, A. Translating human effective jejunal intestinal permeability to surface-dependent intrinsic permeability: a pragmatic method for a more mechanistic prediction of regional oral drug absorption. *Journal American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS Journal)*, 17 (2015) 1177–1192.
- Orlikova, B., Schumacher, M., Juncker, T., Yan, C.C., Inayat-Hussain, S.H., Hajjouli, S., Cerella, C., Dicato, M., Diederich, M. Stzrzl-lactone goniothalamine inhibits TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation. *Food and Chemical Toxicology*, 59 (2013) 572–578.
- Oros, Gy., Cserháty, T. Relationship, between the calculated physicochemical parameters and reversed phase thin-layer chromatographic retention behavior of carboxamide fungicides and related compounds. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 33 (2010) 880–893.
- Pardridge, W.M. Transport of small molecules through the blood-brain barrier: biology and methodology. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 15 (1995) 5–36.
- Pardridge, W. M. (1998). CNS drug design based on principles of blood-brain barrier transport. *Journal of Neurochemistry*, 70 (1998) 1781–1792.
- Pathan, S., Ali, S.M., Shrivastava, M. Quantitative structure activity relationship and drug design: A review. *International Journal of Research in Bioscience*, 5 (2016) 1–5.
- Paul, Y., Dhake, A.S., Singh, B. In silico quantitative structure pharmacokinetic relationship modeling of quinolones: Apparent volume of distribution. *Asian Journal of Pharmaceutics*, July-September (2009) 202–207.
- Perišić-Janjić, N., Kaliszan, R., Wiczling, P., Milošević, N., Ušćumlić, G., Banjac, N. Reversed-phase TLC and HPLC retention data in correlation studies with in silico molecular descriptors and druglikeness properties of newly synthesized anticonvulsant succinimide derivatives. *Molecular Pharmaceutics*, 8 (2011) 555–563.
- Perišić-Janjić, N., Kaliszan, R., Milošević, N., Ušćumlić, G., Banjac, N. Chromatographic retention parameters in correlation analysis *in silico* biological descriptors of a novel series N-phenyl-3-methyl succinimide. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 72 (2013) 65–73.
- Perkins, R., Fang, H., Tong, N.J., Welsh, W.J. Quantitative structure-activity relationship methods: Perspectives on drug discovery and toxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22 (2003) 1666–1679.
- Perušćević, D.S., Stevanović, N.R., Lolić, A.D., Baošić, R.M. Correlation between structure, retention and lipophilicity of some antidepressants: QSRR and QSAR studies. *Letters in Drug Design & Discovery*, 11 (2014) 1–7.
- Poole, C.F., Schuette, S.A. Contemporary practice of chromatography. Elsevier, Amsterdam, 1984, 284.

- Popsavin, V., Srećo, B., Krstić, M., Francuz, J., Popsavin, M., Kojić, V., Bogdanović, G. Synthesis and antitumour activity of new muricatacin and of goniofufurone analogues. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 41 (2006) 1217–1222.
- Popsavin, V., Benedeković, G., Srećo, B., Popsavin, M., Francuz, J., Kojić, V., Bogdanović, G. Divergent synthesis of cytotoxic styryl lactones from D-xylose. The first total synthesis of (+)-crassalactone C. *Organic Letters*, 9 (2007) 4235–4238.
- Popsavin, V., Benedeković, G., Srećo, B., Popsavin, M., Francuz, J., Kojić, V., Bogdanović, G. Synthesis and antiproliferative activity of unnatural enantiomers of 7-epi-goniofufurone and crassalactone C. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18 (2008) 5178–5181.
- Popsavin, V., Benedeković, G., Srećo, B., Francuz, J., Popsavin, M., Kojić, V., Bogdanović, G., Divjaković, V. Enantiodivergent synthesis of cytotoxic styryl lactones from D-xylose. The first total synthesis of (+)- and (-)-crassalactone C. *Tetrahedron*, 65 (2009) 10596–10607.
- Popsavin, V., Srećo, B., Benedeković, G., Francuz, J., Popsavin, M., Kojić, V., Bogdanović, G. Design, synthesis and antiproliferative activity of styryl lactones related to (+)-goniofufurone. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45 (2010a) 2876–2883.
- Popsavin, V., Benedeković, G., Popsavin, M., Kojić, V., Bogdanović, G. Divergent synthesis of cytotoxic styryl lactones isolated from *Polyalthia crassa*. The first total synthesis of crassalactone B. *Tetrahedron Letters*, 51 (2010b) 3426–3249.
- Popsavin, V., Kovačević, I., Benedeković, G., Popsavin, M., Kojić, V., Bogdanović, G., Divjaković, V. Divergent synthesis of cytotoxic styryl lactones related to goniobutenolides A and B, and to crassalactone D. *Organic Letters*, 14 (2012) 5956–5959.
- Prachayasittikul, V., Pingaew, R., Apilak Worachartcheewan, A., Sitthimonchai, S., Nantasenamat, C., Prachayasittikul, S., Ruchirawat, S., Prachayasittikul, V. Aromatase inhibitory activity of 1,4-naphthoquinone derivatives and QSAR study. *EXCLI Journal*, 14 (2017) 714–726.
- PreADMET <<http://preadmet.bmdrc.org/>>. (25.01.2017.)
- Protein Data Bank ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)). (4.04.2017.)
- Pyka, A. Lipophilicity investigations of ibuprofen. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 32 (2009) 723–731.
- Raies, A.B., Bajic, V.B. *In silico* toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity. *Advanced Review*, 6 (2016) 147–172.
- Ralph, M., Ng, S., Booker-Milburn, K.I., Short Flow-Photochemistry Enabled Synthesis of the Cytotoxic Lactone (+)-Goniofufurone. *Organic Letters*, 18 (2016) 968–971.
- Reeta, S., Jagtar, S., Bhupinder, S., Yash, P. *In silico* quantitative structure-pharmacokinetic relationship studies: An overview. *International Journal of Pharmaceutical Innovations*, 4 (2014) 19–39.
- Robine, O. A review on anti-tubercular activity of neutral compounds from medicinal plants and their drug-likeness. *Journal of Science*, 1 (2015) 10–22.
- Rutkowska, E., Pajak, K., Józwiak, K. Lipophilicity – Methods of determination and its role in medicinal chemistry. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 70 (2013) 3–18.
- Sangster, J. Octanol-water partition coefficient of simple organic compounds. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 18 (1989) 1111–1120.

- Sârbu, C., Onisor, C., Posa, M., Kevresan, S., Kuhajda, K. Modeling and prediction (correction) of partition coefficients of bile acids and their derivatives by multivariate regression methods. *Talanta*, 75 (2008) 651–657.
- Schmidt, S., Gonzales, D., Derendorf, H. Significance of protein binding in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Journal of Pharmaceutical Science*, 99 (2010) 1107–1122.
- Seyed, M.A., Jantan, I., Bukhari, S.N.A. Emerging anticancer potentials of goniothalamin and its molecular mechanisms. *BioMed Research International*, (2014) 1–10. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/536508> (29.09.2015.)
- Shadrack, D.M., Ndesendo, V.M.K. Molecular docking and ADMET study of emodin derivatives as anticancer inhibitors of NAT2, COX2 and TOP1 enzymes. *Computational Molecular Bioscience*, 7 (2017) 1–18.
- Sharma, R., Majer, F., Peta, V.K. Wang, J., Keaveney, R., Kelleher, D., Long, A., Long, A., Gilmer, J.F. Bile acid toxicity structure-activity relationships: correlations between cell viability and lipophilicity in a panel of new and known bile acids using an oesophageal cell line (HET-1A). *Biorganic Medical Chemistry*, 18 (2010) 6886–6895.
- Shin, S.W., Kim, S.Y., Park, J-W. Autophagy inhibition enhances ursolic acid-induced apoptosis in PC3 cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1823 (2012) 451–457.
- Shirzad, M., Beshkar, P., Heidarian, E. The effects of hesperetin on apoptosis induction and inhibition off cell proliferation in the prostate cancer PC3 cells. *Journal of HerbMed Pharmacology*, 4 (2015) 121–124.
- Sichrovska, L.H., Malik, I., Sedlarova, E., Csollei, J., Stanzel, L., Galisinova, J., Andriamainty, F. Prediction of blood-brain barrier penetration of *meta-/para*-alkoxyphenylcarbamic acid esters bearing substituted *N*-phenylpiperazine fragment. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Science*, 13 (2014) 7–14.
- Snyder, L.R., Dolan, J.W., Gant, J.R. Gradient elution in high-performance liquid chromatography: I. Theoretical basis for reversed-phase systems. *Journal of Chromatography*, 165 (1979) 3–30.
- Soczewiński, E., Wachtmeister, C.A. The relation between the composition of certain ternary two-phase solvent systems and  $R_M$  values. *Journal of Chromatography*, 7 (1962) 311–320.
- Sreelekshmi, P.B., Harikumar, B., Resmi, K.S., Sheena Mary, Y., Yohannan Panicker, C., Van Alsenoy, C.FT-IR, NBO, MEP, NLO and molecular docking studies of 8-epi-9-deoxy goniopyrone. *Chemical Informatics*, 2 (2015) 1–9.
- Stepensky, D. Use unbound volumes of drug distribution in pharmacokinetic calculations. *European Journal of Pharmaceutical Science*, 42 (2011) 91–98.
- Subirats, X., Rosés, M., Bosch, E. High-throughput logPo/w determination from UHPLC measurements: Revisiting the chromatographic hydrophobicity index. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 5 (2016) 26–31.
- Sun, L., Liu, X., Xiang, R., Wu, C., Wang, C., Sun, Y., Sun, J., He, Z. Structure-based prediction of human intestinal membrane permeability for rapid *in silico* BCS classification. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 34 (2013) 321–335.
- Tangchirakhaphan, S., Innajak, S., Nilwarangkoon, S., Tanjapatkul, N., Mahabusrakum, W., Watanapokasin, R. Mechanism of apoptosis induction associated with ERK1/2 upregulation via goniothalamin in melanoma cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15 (2018) 3052–3058.

- Terfloth, L. Chemoinformatics: A Textbook. Gasteiger, J., Engel, T., Eds. Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2003, 401–437.
- Tetko, I.V., Tanchuk, V.Y., Villa, A.E. Prediction of *n*-octanol/water partition coefficients from PHYSPROP database using artificial neural networks and E-state indices. *Journal of Chemical information and computer sciences*, 41 (2001) 1407–1421.
- Tetko, I.V., Poda, G.I., Ostermann, C., Mannhold, R. Accurate *in silico* log*P* predictions one can't embrace the unembraceable. *QSAR & Combinatorial Science*, 28 (2009) 845–849.
- The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.
- Tian, Z., Chen, S., Zhang, Y., Huang, M., Shi, L., Huang, F., Fong, C., Yang, M., Xiao, P. The cytotoxicity of naturally occurring styryl lactones. *Phytomedicine*, 13 (2006) 181–186.
- Thientithi, K., Tuchinda, P., Wongnoppavich, A., Anantachoke, N., Soonthornchareonnon, N. Cytotoxic effect of compounds isolated from *Goniothalamus marcanii* Crab stem barks. *Pharmaceutical Science Asia*, 44 (2017) 86–95.
- Todeschini, R., Gramatica, P. New 3D Molecular Descriptors: The WHIM theory and QSAR Applications. In: Kubinyi, H., Folkers, G., Martin, Y.C. (eds). Three-Dimensional Quantitative structure Activity Relationships, 2<sup>nd</sup> Edition, Springer, Amsterdam, 1998, 355–380.
- Todeschini, R., Consonni, V., Handbook of molecular descriptors. In: Mannhold, R., Kubinyi, H., Timmerman, H. (Eds.) Methods and principles in medicinal chemistry. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2000.
- Topliss, J.G., Costello, R.J. Chance correlations in structure-activity studies using multiple regression analysis, *Journal of Medicinal Chemistry*, 15 (1972) 1066–1068.
- Tosti, T., Natić, M., Dabić, D., Milić, D., Milojković-Opsenica, D., Tešić, Ž. Structure-retention relationship study of polyoxygenated steroids. *Journal of Separation Science*, 35 (2012) 2693–2698.
- Tran, D.T., Mai, H.D.T., Pham, V.C. Nguyen, V.H., Litaudon, M., Guéritte, F., Nguyen, Q.V., Tran, T.A., Chau, V.M. Alkaloids and styryllactones from the leaves of *Goniothalamus tamirensis*. *Phytochemistry Letters*, 6 (2013) 79–83.
- Tuchinda, P., Munyoo, B., Pohmakotr, M., Thinapong, P., Sophasan, S., Santisuk, T., Reutrakul, V. Cytotoxic styryl lactones from the leaves and twigs of *Polyalthia crassa*. *Journal of Natural Products*, 69 (2006) 1728–1733.
- Tuzimski, T., Sztanke, K. Retention data for some carbonyl derivatives of imidazo[2,1-*c*][1,2,4]triazine in reversed-phase TLC and HPLC and their use for determination of lipophilicity. Part 1. Lipophilicity of 8-aryl-3-phenyl-6,7-dihydrop-4H-imidazo[2,1-*c*][1,2,4]triazin-4-ones. *Journal of Planar Chromatography*, 18 (2005) 274–281.
- Tyrkkö, E., Pelander, A., Ojanperä, I. Prediction of liquid chromatographic retention for differentiation of structural isomers. *Analytica Chimica Acta*, 720 (2012) 142–148.
- Valkó, K., Slégel, P. New chromatographic hydrophobicity index ( $\phi_o$ ) based on the slope and the intercept of the log*k* versus organicphase concentration plot. *Journal of Chromatography*, 631 (1993) 49–61.
- Valkó, K. Application of high-performance liquid chromatography based measurements of lipophilicity to model biological distribution, *Journal of Chromatography A*, 1017 (2004) 299–310.

- Valkó, K. Lipophilicity and biomimetic properties measured by HPLC to support drug discovery. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 130 (2016) 35–54.
- van Breemen, R.B., Li, Y. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 1 (2005) 175–185.
- van de Waterbeemd, H., Smith, D.A., Jones, B.C. Lipophilicity in PK design: methyl, ethyl, futile. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 15 (2001) 273–286.
- Varshney, A. Ligand binding strategies of human serum albumin: How can the cargo are utilized. *Chirality*, 22 (2010) 77–87.
- Vaštag, D., Perišić-Janjić, N., Tomić, J., Petrović, S. Evaluation of the lipophilicity and prediction of biological activity of some *N*-cyclohexyl-*N*-substituted-2-phenylacetamide derivatives using RP-TLC. *Journal of Planar Chromatography –Modern TLC*, 24 (2011) 435–440.
- VCCLAB, 2005. Virtual Computational Chemistry Laboratory <<http://www.vcclab.org/>>. (22.10.2016.)
- Vella, J., Mifsud, M., Sammut Bartolo, N., Ferrito, V., Serracino-Inglott, A., Azzopardi, L.M., Laferla, G. The combined effects of pH and acetonitrile composition on the separation of two lincosamide antibiotics. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 7 (2014) 96–100.
- Veerasamy, R., Rajak, H., Jain, A., Sivadasan, S., Vardhese, C.P., Agrawal, R.K. Validation of QSAR models – Strategies and importance. *International Journal of Drug Design and Discovery*, 2 (2011) 511–519.
- Vilar, S., Costanzi, S. Predicting biological activities through QSAR analysis and docking-based scoring. *Methods in Molecular Biology*, 914 (2012) 271–284.
- Volpe, D.A. Drug-permeability and transporter assays in Caco-2 and MDCK cell lines. Review. *Future Medicinal Chemistry*, 3 (2011) 2063–2077.
- Wada, D.R., Drover, D.R., Lemmens, H.J.M. Determination of the distribution volume that can be used to calculate the intravenous loading dose. *Clinical Pharmacokinetics*, 35 (1998) 1–7.
- Wang, S.R., Chen, C., Xiong, M.J., Wu, L.P., Ye, L.M. Quantitative retention-activity relationship models of angiotensin converting enzyme inhibitors using biopartitioning micellar chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 48 (2010) 134–139.
- Wang, J., Krudy, G., Xie, X-Q., Wu, C., Holland, G. Genetic algorithm-optimized QSPR Models for bioavailability, protein binding, and Urinary excretion. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 46 (2006) 2674–2683.
- Wang, Y., Xing, J., Yuan Xu, Y., Zhou, N., Peng, J., Xiong, Z., Liu, X., Luo, X., Luo, C., Chen, K., Zheng, M., Jiang, H. In silico ADME/T modelling for rational drug design. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 48 (2015) 488–515.
- Waring, M.J. Lipophilicity in drug discovery. *Expert Opinion Drug Discovery*, 5 (2010) 235–248.
- Waterhouse, R.N. Determination of lipophilicity and its use as predictor of blood-brain barrier penetration of molecular imaging agents. *Molecular Imaging and Biology*, 5 (2003) 376–389.

- Wessel, M.D., Jurs, P.C., Tolan, J.W., Muskal, S.M. Prediction of human intestinal absorption of drug compounds from molecular structure. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 38 (1998) 726–735.
- Wiert, C. *Goniothalamus* Species: A Source of drugs for the treatment of cancers and bacterial infections? *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 4 (2007) 299–311.
- Winiwarter, S., Bonham, N.M., Ax, F., Hallberg, A., Lennernas, H., Karlen, A. Correlation of human jejunal permeability (*in vivo*) of drug with experimentally and theoretically derived parameters. A multivariate data analysis approach. *Journal of Medicinal Chemistry*, 41 (1998) 4939–4949.
- Xu, H.R., Fu, L., Zhan, P., Liu, X.Y. 3D-QSAR analysis of a series of S-DABO derivatives as anti HIV agents By CoMFA and CoMSIA. *SAR and QSAR in Environmental Research*, 27 (2016) 999–1014.
- Yamashita, F., Hashida, M. *In silico* approaches for predicting ADME properties of drugs. Review. *Drug Metabolism Pharmacokinetics*, 19 (2004) 327–338.
- Yang, J., Li, F., Xu, G., Chu, Y., Jiang, N. The three dimensional quantitative structure activity relationship (3D-QSAR) and docking studies of curcumin derivatives as androgen receptor antagonists. *International Journal of Molecular Science*, 13 (2012) 6138–6155.
- Young T. M., Shaffer L. B., Guess F. M., Bensmail H., León R. V., A comparison of multiple linear regression and quantile regression for modeling the internal bond of medium density fiberboard. *Forest Product Journal*, 58 (2008) 39–48.
- Zare, S., Fereidoon nezahad, M., Afshar, D., Ramezani, Z. A comparative QSAR analysis and molecular docking studies of phenyl piperidine derivatives as potent dual NK1R. *Computational Biology and Chemistry*, 67 (2017) 22–37.
- Zhao, Y.H., Abraham, M.H., Lee, J., Hersey, A., Luscombe, Ch.N., Beck, G., Sherborne, B., Cooper, I. Rate-limited steps of human oral absorption and QSAR studies. *Pharmaceutical Research*, 19 (2002) 1446–1457.
- Zhou, F.S., Tang, W.D., Mu, Q., Yang, G.X., Wang, Y., Liang, G.L., Lou, L.G. Semisynthesis and antitumor activities of new styryl-lactone Derivatives. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 53 (2005) 1387–1391.
- Żydek, G., Brzezińska, E. Development and validation of quantitative structure-activity relationship models for compound acting on serotonergic receptors. *The Scientific World Journal*, 2012, 1–11. Doi: 10.1100/2012/157950.
- [http://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/Toxicology\\_Dose\\_Descriptors.html](http://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/Toxicology_Dose_Descriptors.html)  
(16.07.2017.)

## **7. PRILOG**



*Tabela P-7.1.1. Retencioni podaci  $k$ ,  $\log k$ , retencione konstante  $\log k_0$  i  $S$  i statistički parametri linearne zavisnosti retencije ispitivanih stiril laktona od zapreminskog udela metanola ( $\phi_{\text{MeOH}}$ )  $\log k - \phi$  (jednačina 2.5) u pokretnoj fazi metanol-voda*

Jed.	$\phi_{\text{MeOH}}$														
	0,60		0,625		0,65		0,675		0,70		S	$\log k_0$	$R^2$	SD	p
	k	$\log k$	k	$\log k$	k	$\log k$	k	$\log k$	k	$\log k$					
<b>I.1</b>	0,337	-0,472	0,276	-0,560	0,245	-0,610	0,196	-0,707	0,196	-0,782	-3,068	1,3680	0,9933	0,016	0,0002
<b>I.2</b>	0,276	-0,559	0,237	-0,624	0,217	-0,690	0,170	-0,770	0,140	-0,854	-2,944	1,2142	0,9963	0,008	<0,0001
<b>I.3</b>	3,591	0,555	2,665	0,426	2,075	0,317	1,483	0,171	1,229	0,089	-4,748	3,3978	0,9945	0,016	0,0002
<b>II.1</b>	0,504	-0,298	0,419	-0,378	0,365	-0,438	0,288	-0,541	0,251	-0,600	-3,068	1,5432	0,9936	0,011	0,0002
<b>II.2</b>	1,665	0,221	1,362	0,134	1,137	0,056	0,908	-0,042	0,736	-0,133	-3,536	2,3456	0,9987	0,006	<0,0001
<b>II.3</b>	1,686	0,227	1,289	0,110	1,078	0,032	0,863	-0,064	0,733	-0,135	-3,592	2,3688	0,9932	0,014	<0,0001
<b>II.4</b>	1,177	0,071	0,992	-0,004	0,857	-0,067	0,701	-0,154	0,573	-0,242	-3,104	1,9384	0,9959	0,009	0,0001
<b>II.5</b>	3,159	0,499	2,421	0,384	1,894	0,277	1,441	0,159	1,143	0,058	-4,428	3,1536	0,9995	0,004	<0,0001
<b>II.6</b>	1,657	0,219	1,364	0,135	1,110	0,045	0,863	-0,064	0,688	-0,162	-3,844	2,5332	0,9977	0,008	<0,0001
<b>II.7</b>	3,068	0,487	2,408	0,382	1,872	0,272	1,414	0,150	1,111	0,046	-4,456	3,1638	0,9994	0,005	<0,0001
<b>III.1</b>	3,700	0,568	2,664	0,425	2,031	0,308	1,484	0,171	1,216	0,085	-4,880	3,4834	0,9941	0,017	0,0002
<b>III.2</b>	3,262	0,514	2,512	0,400	1,883	0,275	1,496	0,175	1,146	0,059	-4,540	3,2356	0,9991	0,006	<0,0001
<b>III.3</b>	3,803	0,580	2,786	0,442	2,075	0,317	1,496	0,175	1,168	0,068	-5,164	3,6730	0,9983	0,010	<0,0001
<b>III.4</b>	3,714	0,570	2,851	0,455	2,111	0,324	1,663	0,221	1,316	0,119	-4,544	3,2914	0,9976	0,010	<0,0001
<b>III.5</b>	3,360	0,513	2,418	0,383	1,809	0,257	1,282	0,108	1,035	0,015	-5,084	3,5598	0,9962	0,014	<0,0001
<b>III.6</b>	14,791	1,170	10,965	1,040	7,780	0,891	5,495	0,740	4,027	0,605	-5,720	4,6072	0,9994	0,007	<0,0001
<b>III.7</b>	13,804	1,140	9,886	0,995	7,079	0,850	5,129	0,710	3,872	0,588	-5,556	4,4680	0,9989	0,008	<0,0001
<b>IV.1</b>	7,108	0,852	4,873	0,688	3,536	0,548	2,489	0,396	2,001	0,301	-5,576	4,1814	0,9928	0,022	0,0002
<b>IV.2</b>	5,808	0,764	3,959	0,598	2,929	0,467	1,978	0,296	1,478	0,170	-5,960	4,3330	0,9978	0,013	<0,0001
<b>IV.3</b>	6,174	0,790	4,571	0,660	3,309	0,520	2,455	0,390	1,846	0,266	-5,272	3,9520	0,9996	0,005	<0,0001
<b>IV.4</b>	7,127	0,853	4,897	0,698	3,682	0,566	2,601	0,415	2,041	0,310	-5,476	4,1278	0,9964	0,015	<0,0001
<b>IV.5</b>	5,164	0,713	4,325	0,636	3,467	0,540	2,606	0,416	2,118	0,326	-3,976	3,1112	0,9944	0,014	0,0002
<b>IV.6</b>	5,704	0,756	3,971	0,599	2,865	0,457	1,969	0,294	1,480	0,170	-5,908	4,2954	0,9985	0,010	<0,0001
<b>IV.7</b>	6,347	0,802	4,656	0,668	3,391	0,530	2,570	0,410	1,918	0,283	-5,184	3,9082	0,9994	0,008	<0,0001

Tabela P-7.2. Retencioni podaci  $k$ ,  $\log k$ , retencione konstante  $\log k_0$  i  $S$  i statistički parametri linearne zavisnosti retencije ispitivanih stiril laktona od zapreminskog udela acetonitrila ( $\varphi_{\text{ACN}} \log k - \varphi$  (jednačina 2.5) u pokretnoj fazi acetonitril-voda

Jed.	$\varphi_{\text{ACN}}$														
	0,45		0,50		0,55		0,60		0,65		S	$\log k_0$	$R^2$	SD	P
	k	$\log k$	k	$\log k$	k	$\log k$	k	$\log k$	k	$\log k$					
<b>I.1</b>	0,435	-0,361	0,370	-0,432	0,334	-0,476	0,292	-0,535	0,247	-0,607	-1,190	0,1723	0,9950	0,008	0,0002
<b>I.2</b>	0,349	-0,457	0,312	-0,506	0,288	-0,541	0,260	-0,585	0,229	-0,640	-0,890	-0,0563	0,9942	0,006	0,0001
<b>I.3</b>	3,350	0,525	2,455	0,390	1,702	0,231	1,297	0,113	0,970	-0,013	-2,706	1,7375	0,9975	0,012	<0,0001
<b>II.1</b>	3,559	0,526	2,505	0,399	1,898	0,278	1,503	0,177	1,184	0,073	-2,256	1,5314	0,9973	0,011	0,0003
<b>II.2</b>	2,675	0,427	1,925	0,284	1,428	0,155	1,127	0,052	0,868	-0,061	-2,416	1,5002	0,9958	0,014	0,0001
<b>II.3</b>	2,216	0,346	1,642	0,216	1,244	0,095	1,010	0,004	0,798	-0,098	-2,200	1,3226	0,9948	0,014	0,0002
<b>II.4</b>	1,965	0,293	1,494	0,174	1,171	0,069	0,934	-0,030	0,735	-0,134	-2,116	1,2382	0,9989	0,006	<0,0001
<b>II.5</b>	5,213	0,717	3,252	0,525	2,289	0,360	1,655	0,219	1,208	0,082	-3,152	2,1142	0,9946	0,021	0,0002
<b>II.6</b>	3,228	0,509	2,186	0,340	1,550	0,190	1,173	0,069	0,867	-0,062	-2,826	1,7635	0,9958	0,017	0,0001
<b>II.7</b>	5,747	0,759	3,621	0,559	2,422	0,384	1,729	0,238	1,235	0,092	-3,310	2,2269	0,9948	0,012	<0,0001
<b>III.1</b>	5,559	0,745	3,990	0,601	2,724	0,435	1,880	0,274	1,317	0,120	-3,150	2,1673	0,9996	0,006	<0,0001
<b>III.2</b>	5,248	0,720	4,385	0,642	3,126	0,495	2,339	0,369	1,738	0,240	-2,466	1,8495	0,9929	0,019	0,0002
<b>III.3</b>	7,865	0,896	4,672	0,669	2,922	0,466	1,979	0,294	1,360	0,134	-3,798	2,5807	0,9945	0,026	0,0002
<b>III.4</b>	3,963	0,598	3,184	0,503	2,421	0,384	1,782	0,251	1,472	0,168	-2,224	1,6040	0,9952	0,014	0,0001
<b>III.5</b>	4,160	0,619	3,083	0,489	1,928	0,285	1,396	0,145	0,868	-0,061	-3,408	2,1698	0,9946	0,023	0,0002
<b>III.6</b>	4,989	0,698	3,648	0,562	2,884	0,460	1,995	0,300	1,640	0,215	-2,456	1,7978	0,9932	0,018	0,0002
<b>III.7</b>	6,918	0,840	4,786	0,680	3,311	0,520	2,291	0,360	1,614	0,208	-3,168	2,2640	0,9999	0,003	<0,0001
<b>IV.1</b>	6,237	0,795	4,368	0,640	2,818	0,450	1,972	0,295	1,380	0,140	-3,310	2,2845	0,9987	0,006	<0,0001
<b>IV.2</b>	5,935	0,773	3,622	0,559	2,323	0,366	1,626	0,211	1,151	0,061	-3,544	2,3432	0,9936	0,026	0,0002
<b>IV.3</b>	6,026	0,780	4,602	0,663	3,404	0,532	2,432	0,386	1,888	0,276	-2,570	1,9409	0,9984	0,010	<0,0001
<b>IV.4</b>	6,124	0,787	4,198	0,623	3,033	0,482	2,070	0,316	1,432	0,156	-3,138	2,1987	0,9965	0,007	<0,0001
<b>IV.5</b>	3,365	0,527	2,630	0,420	1,956	0,291	1,528	0,184	1,190	0,076	-2,276	1,5514	0,9989	0,007	<0,0001
<b>IV.6</b>	5,457	0,734	4,055	0,608	2,564	0,409	1,770	0,248	1,101	0,042	-3,488	2,3266	0,9945	0,024	0,0002
<b>IV.7</b>	5,224	0,718	4,046	0,607	3,069	0,487	2,286	0,359	1,714	0,234	-2,432	1,8186	0,9993	0,006	<0,0001

Tabela P-7.3. *In silico* molekularni deskriptori lipofilnosti korišćeni u QSRR i QSPKR modelovanju

Jed.	Lipofilnost*							Average logP
	ALOGPs	AClogP	miLogP	ALOGP	MLOGP	XLOGP2	XLOGP3	
I.1	0,06	-0,40	-0,16	0,29	0,41	0,43	0,43	0,15
I.2	0,06	-0,40	-0,16	0,29	0,41	0,43	0,43	0,15
I.3	2,40	1,42	1,09	2,28	1,87	2,23	1,91	1,89
II.1	1,60	0,11	-0,02	1,67	1,03	1,41	1,31	1,02
II.2	1,05	0,19	0,07	0,76	0,97	0,92	0,77	0,68
II.3	1,30	-0,11	0,10	0,91	1,08	0,97	0,82	0,72
II.4	1,30	-0,11	0,10	0,91	1,08	0,97	0,82	0,72
II.5	1,58	0,32	0,70	1,47	1,34	1,35	1,43	1,17
II.6	1,58	0,32	0,70	1,47	1,34	1,35	1,43	1,17
II.7	1,70	0,38	0,87	1,67	1,73	1,51	1,53	1,34
III.1	2,94	1,69	1,73	2,80	2,20	2,73	2,53	2,38
III.2	2,98	1,59	1,78	2,79	1,92	2,65	2,51	2,32
III.3	3,00	1,75	1,89	3,01	2,57	2,89	2,63	2,53
III.4	2,98	1,59	1,78	2,79	1,92	2,65	2,51	2,32
III.5	2,77	1,56	1,69	2,70	2,32	2,62	2,36	2,29
III.6	3,82	2,53	2,72	3,63	2,97	3,50	3,65	3,26
III.7	3,83	2,59	2,88	3,84	3,35	3,66	3,75	3,41
IV.1	3,01	1,69	2,82	2,80	2,20	2,73	2,53	2,54
IV.2	2,82	1,56	2,78	2,70	2,32	2,62	2,36	2,45
IV.3	3,02	1,59	2,88	2,79	1,92	2,65	2,51	2,48
IV.4	3,04	1,75	2,98	3,01	2,57	2,89	2,63	2,70
IV.5	5,15	3,78	4,71	5,31	3,71	5,46	5,19	4,76
IV.6	2,82	1,56	2,78	2,70	2,32	2,62	2,36	2,45
IV.7	3,02	1,59	2,88	2,79	1,92	2,65	2,51	2,48

\*ALOGPs, AClogP, ALOGP, MLOGP, XLOGP2, XLOGP3, Average logP (ALOGPS 2.1); miLogP (Molinspiration online program)

Tabela P-7.3. *In silico* molekularni deskriptori lipofilnosti korišćeni u QSRR i QSPKR modelovanju (nastavak)

Jed.	Lipofilnost*							
	ClogP	ACD/logP	logD	AlogpS	AClogS	Average logS	logS	PC
I.1	0,02	-0,03	0,81	-0,40	-1,76	-1,08	-1,63	0,02
I.2	0,02	-0,03	0,81	-0,40	-1,76	-1,08	-1,63	0,02
I.3	1,18	2,81	2,92	-3,35	-3,21	-3,28	-3,34	1,88
II.1	-0,042	0,38	2,39	-1,47	-2,84	-2,15	-1,52	-0,04
II.2	-0,27	1,21	1,92	-1,65	-3,14	-2,39	-2,46	-0,27
II.3	-0,10	1,42	2,61	-1,61	-2,69	-2,15	-2,72	-0,10
I.4	-0,10	1,42	2,61	-1,61	-2,69	-2,15	-2,72	-0,10
II.5	0,40	1,94	2,52	-2,54	-3,36	-2,95	-3,38	0,40
II.6	0,40	1,94	2,52	-2,54	-3,36	-2,95	-3,38	0,40
II.7	0,54	1,95	2,49	-2,80	-3,68	-3,24	0,01	0,54
III.1	2,34	2,69	2,99	-3,69	-3,71	-3,70	-3,86	2,34
III.2	2,26	2,64	3,25	-3,93	-3,73	-3,83	-3,99	2,26
III.3	2,25	2,70	3,14	-4,19	-4,03	-4,11	-4,49	2,48
III.4	2,26	2,64	3,25	-3,93	-3,73	-3,83	-3,99	2,26
III.5	2,08	2,47	3,05	-4,34	-4,17	-4,26	-4,54	-0,95
III.6	3,54	3,25	3,79	-4,99	-4,26	-4,63	-4,64	3,54
III.7	3,68	3,26	4,15	-5,20	-4,57	-4,89	-5,27	3,68
IV.1	2,42	2,23	3,45	-3,76	-3,71	-3,73	-3,83	2,42
IV.2	2,16	2,01	3,27	-4,38	-4,17	-4,27	-4,51	-0,87
IV.3	2,34	2,18	3,56	-3,99	-3,73	-3,86	-3,95	2,34
IV.4	2,56	2,24	3,32	-4,24	-4,03	-4,13	-4,46	2,56
IV.5	5,34	5,01	5,62	-6,08	-5,66	-5,87	-6,63	5,34
IV.6	2,16	2,01	3,27	-4,38	-4,17	-4,27	-4,51	-0,87
IV.7	2,34	2,18	3,56	-3,99	-3,73	-3,86	-3,95	2,34

\* AlogpS, AClogS, Average logS (ALOGPS 2.1); ClogP (ChemBioDraw Ultra); ACD/logP, logD, logS (ACD/Lab I-Lab 2.0); PC (ChemBio3D Ultra 12.0)

*Tabela P-7.4. In silico ADMET deskriptori korišćeni u QSRR i QSPKR modelovanju (PreADMET online program)*

Jed.	ADME			
	PPB, %	BBB	HIA, %	Caco2
<b>I.1</b>	45,283	0,2311	89,190	3,244
<b>I.2</b>	45,283	0,2311	89,190	3,244
<b>I.3</b>	87,259	0,9926	96,119	31,803
<b>II.1</b>	73,748	0,8064	95,284	14,401
<b>II.2</b>	52,728	0,4882	97,105	6327,190
<b>II.3</b>	58,457	0,7155	97,598	33,275
<b>II.4</b>	58,457	0,7155	97,598	33,275
<b>II.5</b>	73,944	0,0905	96,609	24,145
<b>II.6</b>	73,944	0,0905	96,609	24,145
<b>II.7</b>	79,119	0,1519	96,658	31,154
<b>III.1</b>	90,819	0,0454	97,002	17,723
<b>III.2</b>	90,398	0,0626	97,423	31,590
<b>III.3</b>	90,553	0,0391	96,998	29,120
<b>III.4</b>	90,398	0,0626	97,423	31,590
<b>III.5</b>	92,153	0,1476	91,121	3,402
<b>III.6</b>	93,541	0,1006	97,920	45,297
<b>III.7</b>	92,767	0,0843	97,910	49,903
<b>IV.1</b>	90,837	0,0497	97,005	21,777
<b>IV.2</b>	92,163	0,1129	91,121	5,435
<b>IV.3</b>	90,396	0,0651	97,426	33,210
<b>IV.4</b>	90,445	0,0324	97,001	29,598
<b>IV.5</b>	96,454	0,2699	97,875	46,443
<b>IV.6</b>	92,163	0,1129	91,121	5,435
<b>IV.7</b>	90,396	0,0651	97,426	33,210

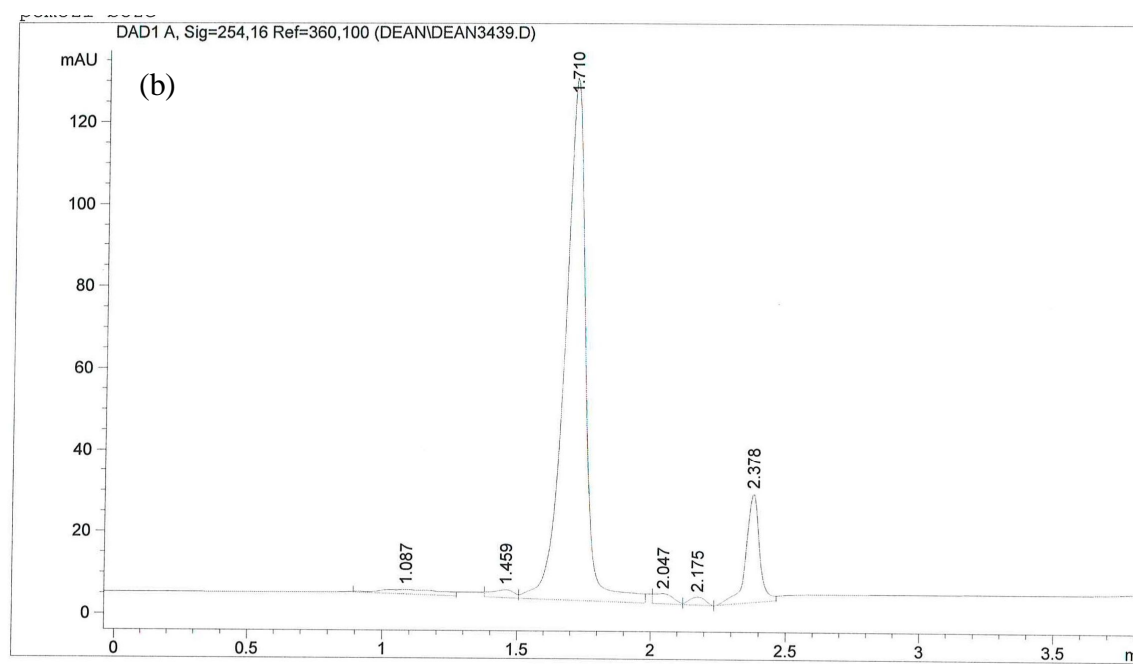
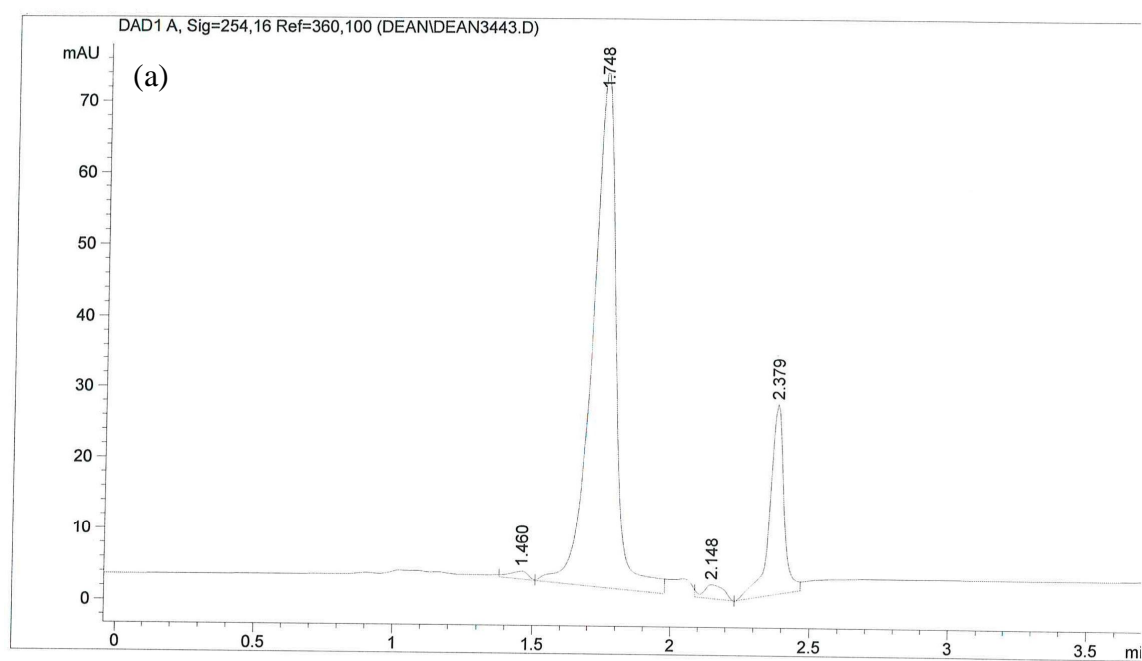
Tabela P–7.5. *In silico* bioaktivni deskriptori korišćeni u QSRR i QSPKR modelovanju (Molinspiration online program <http://www.molinspiration.com>)

Jed.	Bioaktivnost					
	GPCR	ICM	KI	NRL	PI	EI
I.1	0,23	0,05	0,01	-0,01	0,07	0,69
I.2	0,23	0,05	0,01	-0,01	0,07	0,69
I.3	0,27	0,09	0,11	0,18	0,32	0,51
II.1	0,21	0,07	0,02	-0,30	0,12	0,63
II.2	0,23	0,05	-0,01	0,04	0,21	0,35
II.3	0,17	-0,03	-0,01	-0,06	0,13	0,37
II.4	0,17	-0,03	-0,01	-0,06	0,13	0,37
II.5	0,20	-0,14	0,03	0,06	0,27	0,37
II.6	0,20	-0,14	0,03	0,06	0,27	0,37
II.7	0,19	-0,15	0,05	0,08	0,24	0,33
III.1	0,14	-0,05	0,06	0,22	0,11	0,42
III.2	0,09	-0,11	0,02	0,19	0,05	0,35
III.3	0,14	-0,06	0,08	0,23	0,09	0,39
III.4	0,09	-0,11	0,02	0,19	0,05	0,35
III.5	0,00	-0,09	-0,07	0,11	-0,02	0,28
III.6	0,10	0,00	0,04	0,19	0,15	0,36
III.7	0,11	-0,01	0,07	0,19	0,12	0,33
IV.1	0,23	-0,03	0,03	0,16	0,19	0,47
IV.2	0,08	-0,08	-0,09	0,05	0,05	0,32
IV.3	0,17	-0,10	0,00	0,13	0,13	0,39
IV.4	0,23	-0,05	0,05	0,17	0,16	0,43
IV.5	0,07	-0,15	-0,02	0,07	0,07	0,26
IV.6	0,08	-0,08	-0,09	0,05	0,05	0,32
IV.7	0,17	-0,10	-0,01	0,13	0,05	0,39

Tabela P–7.6. *In silico* topološki i geometrijski deskriptori korišćeni u QSPKR modelovanju

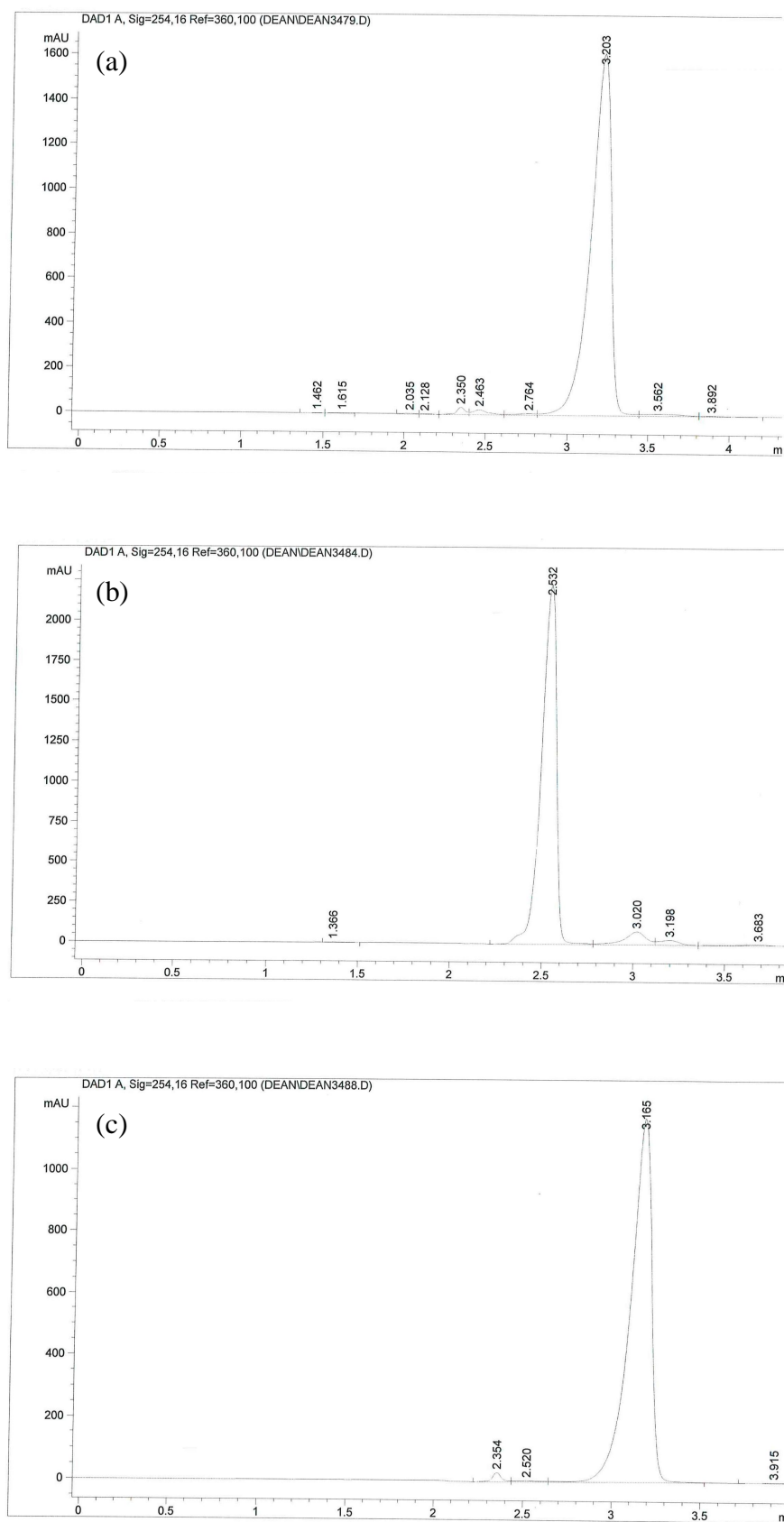
Jed.	Deskriptori				
	<i>natoms-alifatični</i>	<i>nrotb</i>	Površinski napon din/cm	Dreiding-ova energija kcal/mol	MMFF94 kcal/mol
I.1	12	2	63,8	47,15	112,07
I.2	12	2	63,8	45,82	102,16
I.3	13	5	56,8	67,74	143,63
II.1	14	1	48,2	69,59	55,67
II.2	15	1	40,0	73,16	93,78
II.3	13	1	43,1	60,03	78,67
II.4	13	1	43,1	53,93	76,94
II.5	18	4	56,8	81,39	75,32
II.6	18	4	56,8	71,35	67,63
II.7	19	4	55,0	67,89	67,89
III.1	16	6	60,8	78,05	132,72
III.2	18	7	59,7	95,14	150,29
III.3	17	6	58,6	89,74	142,91
III.4	18	7	59,7	96,12	150,16
III.5	19	7	68,3	99,24	192,10
III.6	15	6	54,1	87,62	125,16
III.7	17	6	52,8	87,96	122,05
IV.1	16	6	59,2	76,64	135,29
IV.2	19	7	66,5	81,63	180,92
IV.3	18	7	57,0	80,64	139,15
IV.4	17	6	57,9	74,57	130,65
IV.5	20	10	59,9	138,08	178,81
IV.6	19	7	66,5	79,78	181,34
IV.7	18	7	57,0	79,08	141,11

\* *natoms-alifatični*, *nrotb* (Molinspiration online program; MarvinSketch 15.3.23); Površinski napon (ACD/Lab I-LAB 2.0); Dreiding-ova energija, MMFF94 (MarvinSketch 15.3.23);

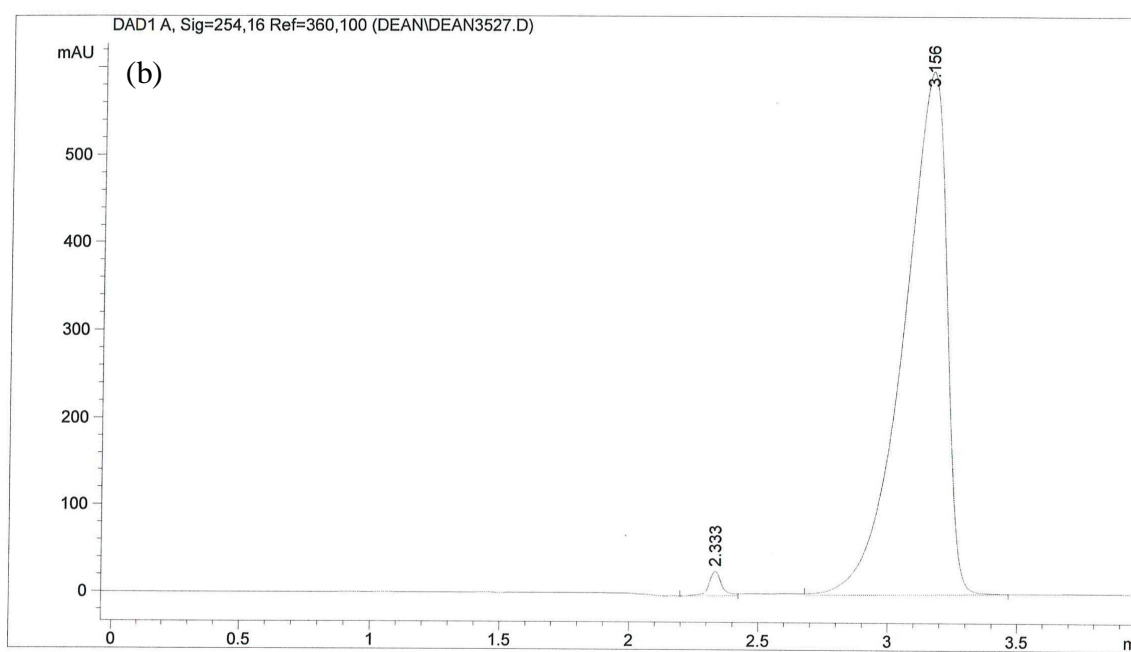
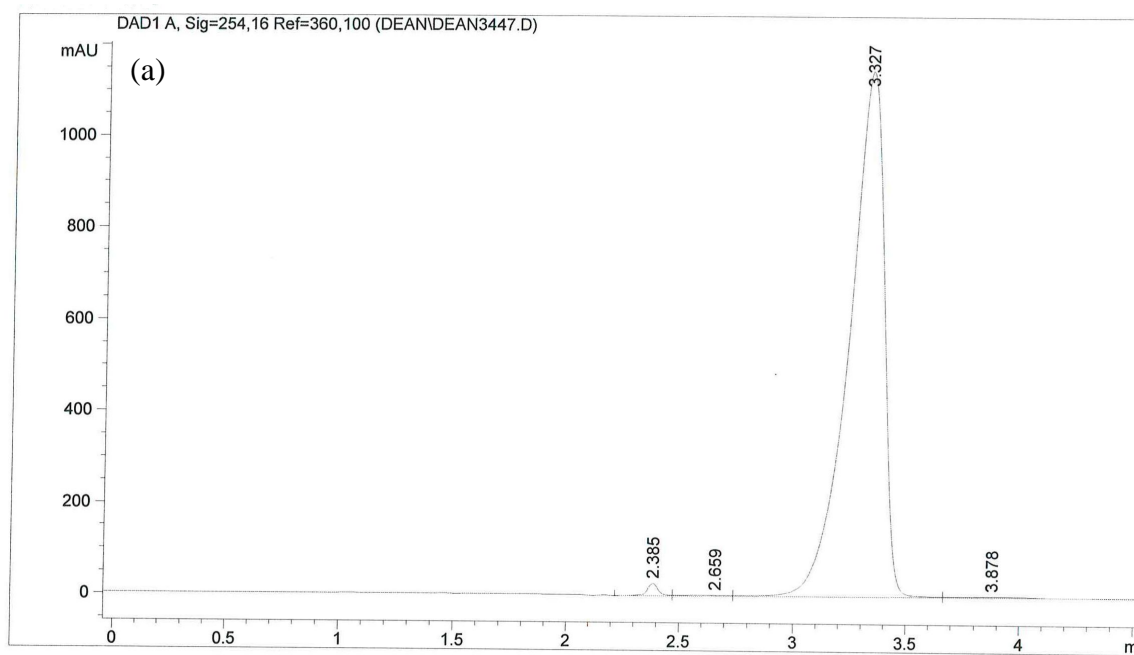


Slika P-7.1. Hromatogrami jedinjenja (a) **I.1** i (b) **I.2** u pokretnoj fazi *metanol-voda* 7:3, V/V

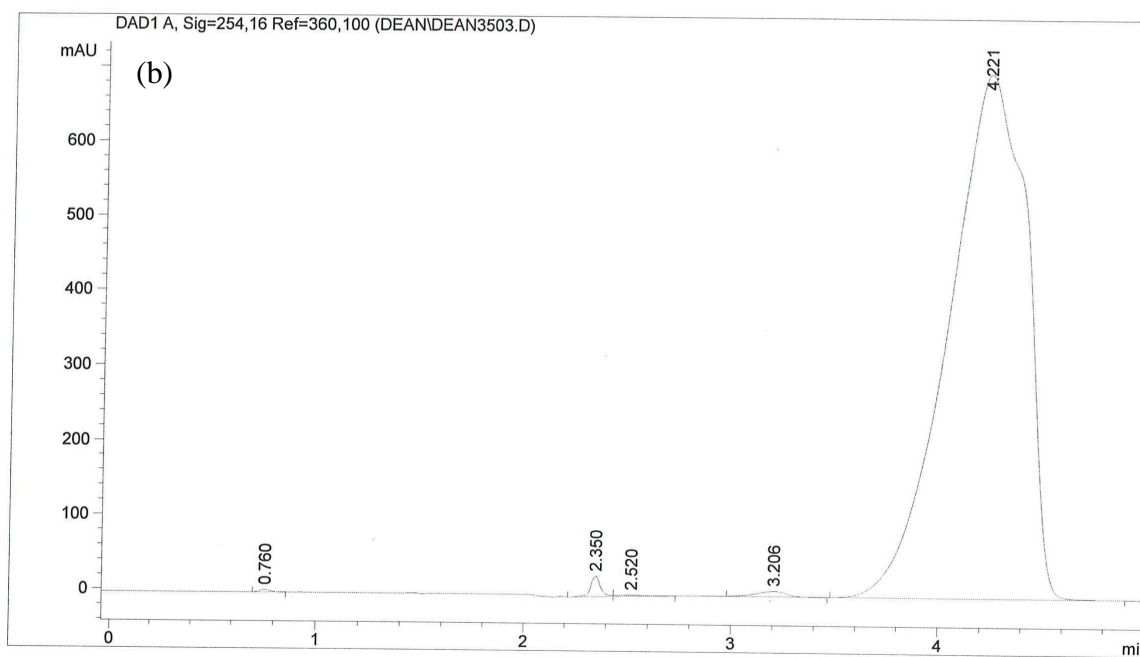
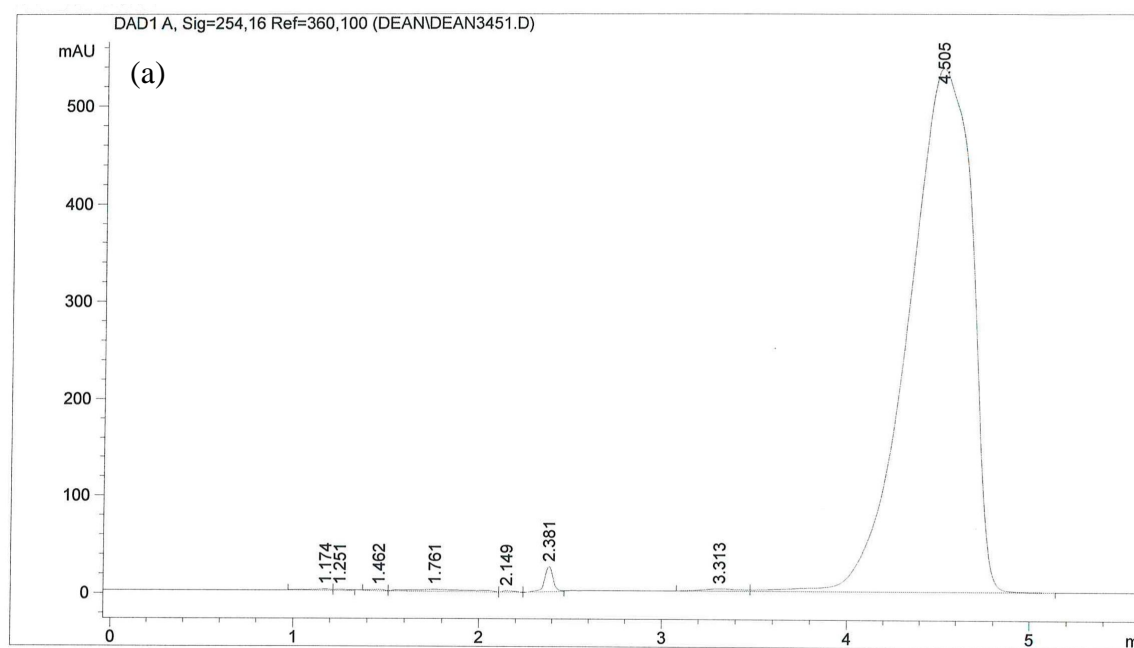




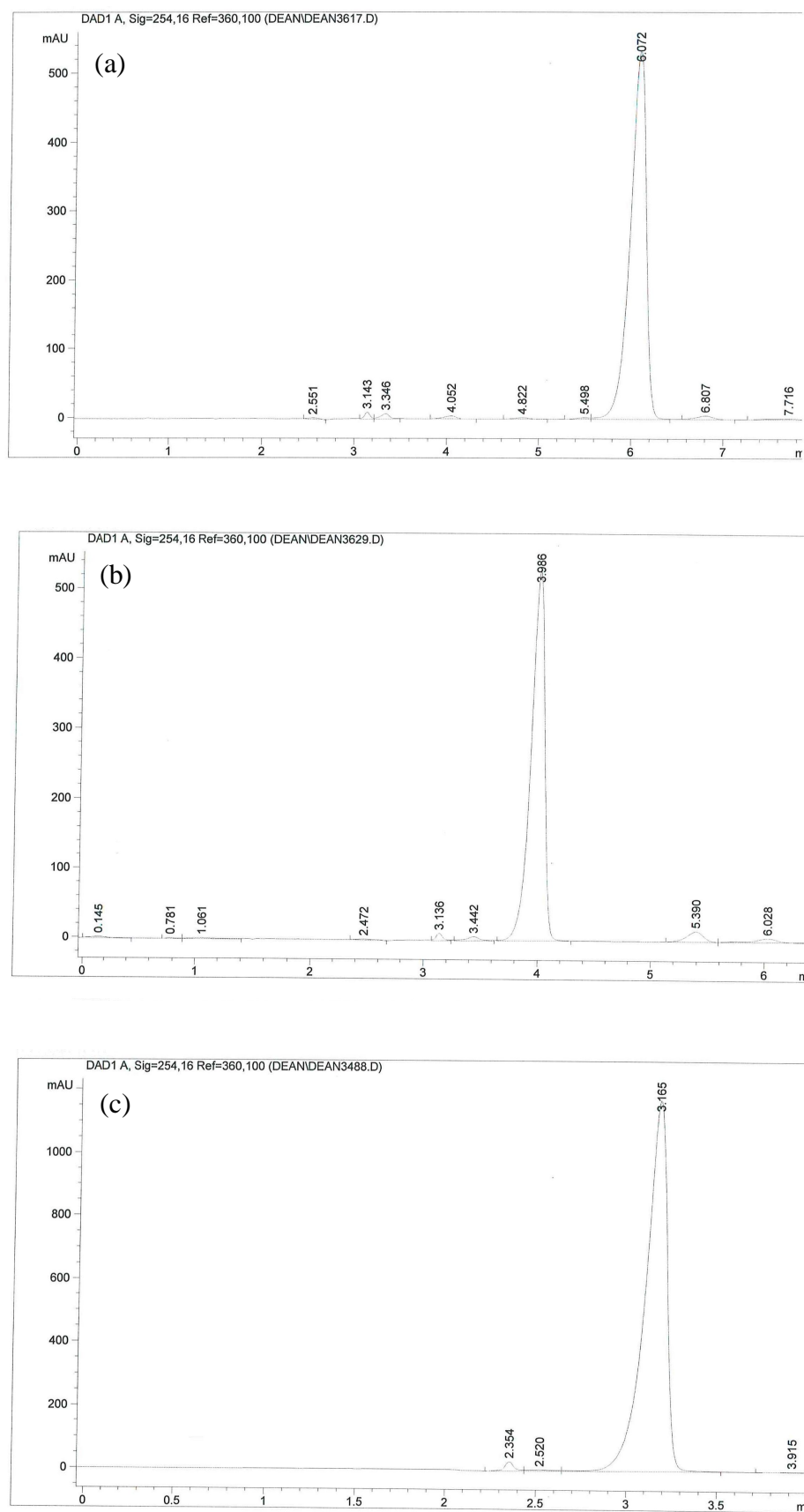
Slika P-7.2. Hromatogrami jedinjenja (a) **II.5**, (b) **II.6** i (c) **II.7** u pokretnoj fazi *metanol-voda* 7:3, V/V



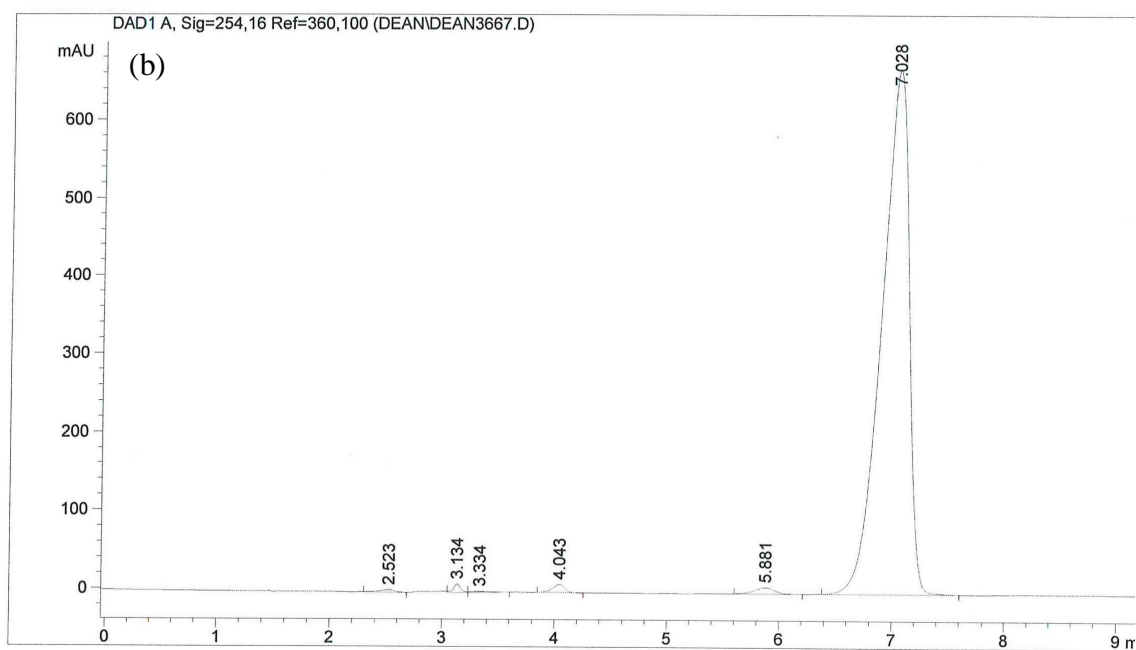
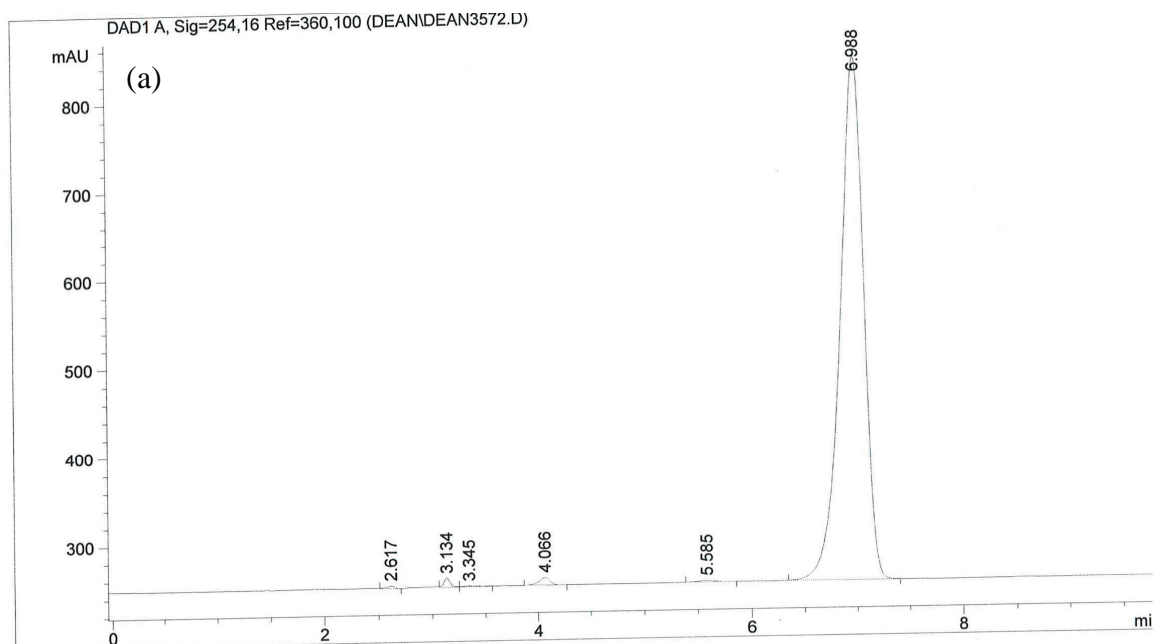
Slika P-7.3. Hromatogrami jedinjenja (a) **III.1** i (b) **III.3** u pokretnoj fazi *metanol-voda* 7:3, V/V



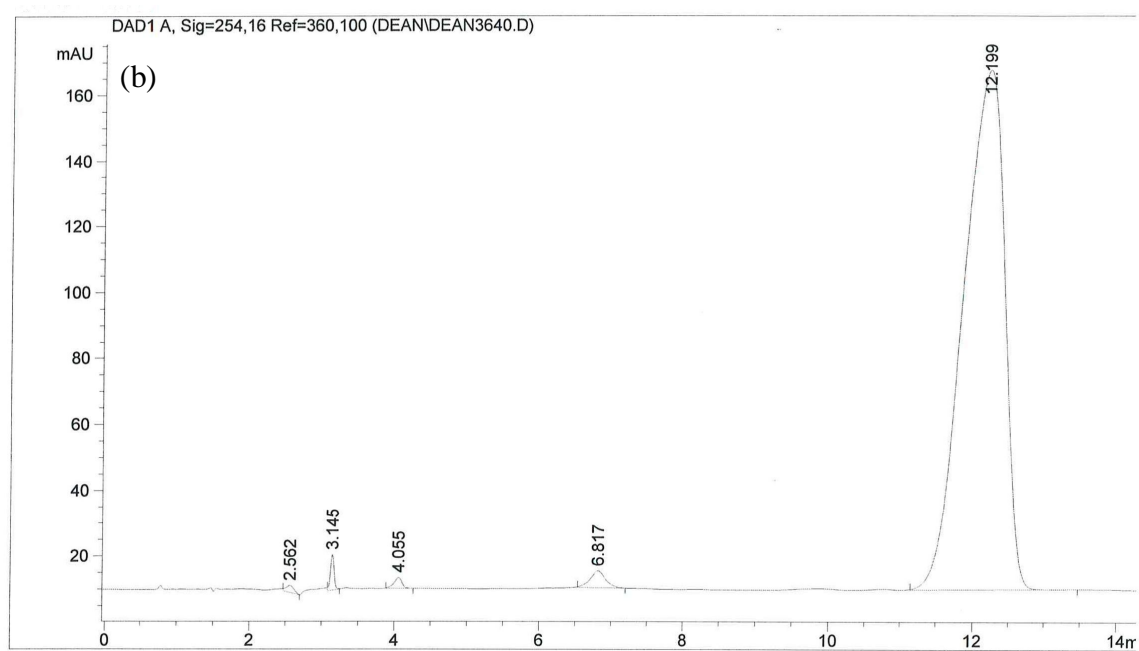
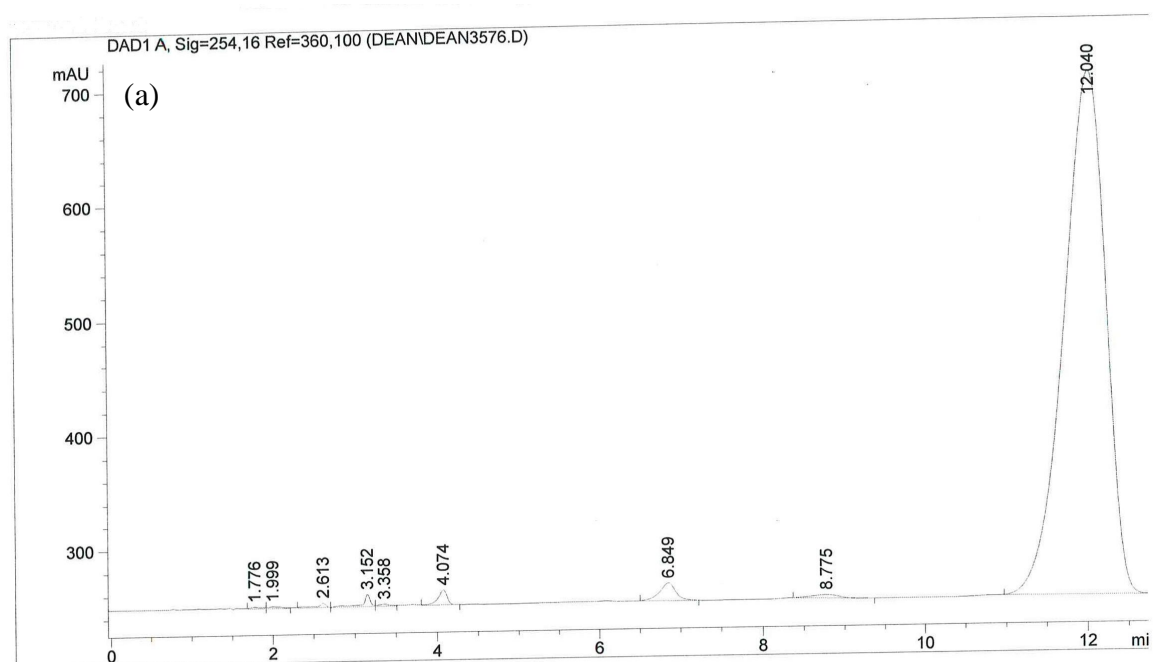
Slika P-7.4. Hromatogrami jedinjenja (a) **IV.1** i (b) **IV.4** u pokretnoj fazi *metanol-voda* 7:3, V/V



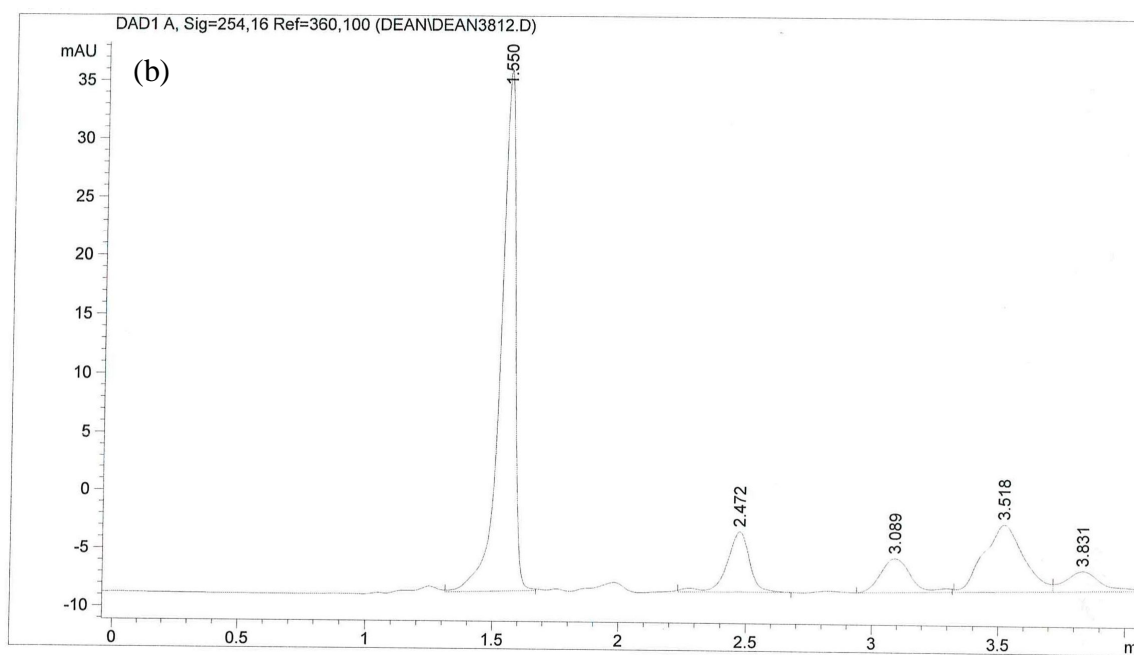
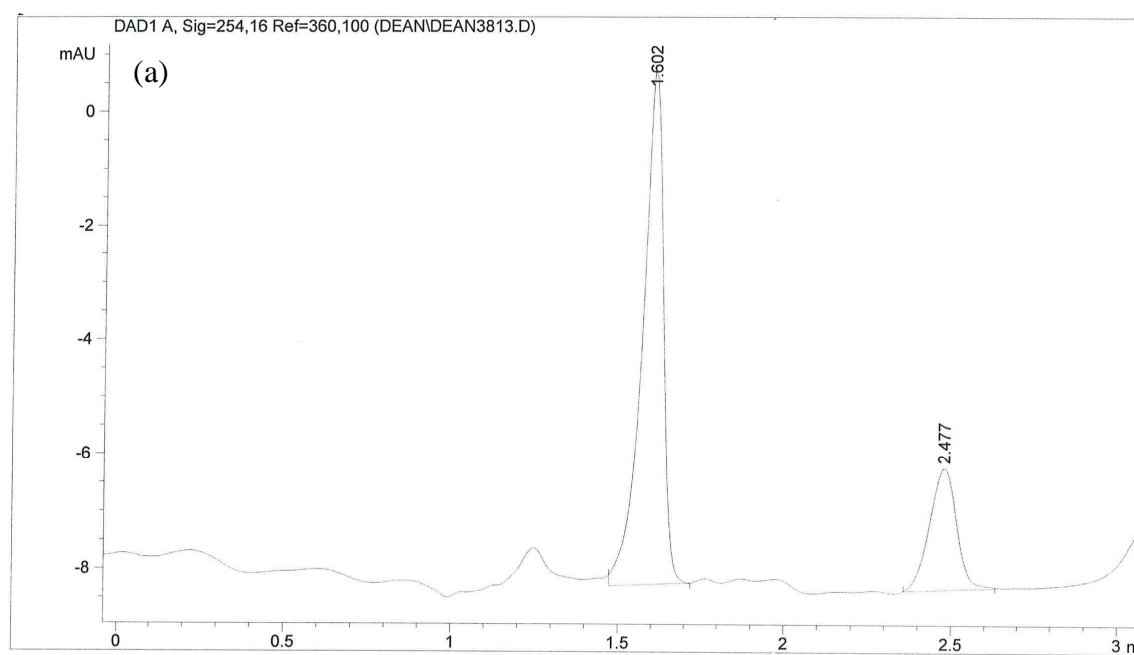
Slika P–7.5. Hromatogrami jedinjenja (a) **II.5**, (b) **II.6** i (c) **II.7** u pokretnoj fazi *metanol-voda* 6:4, V/V



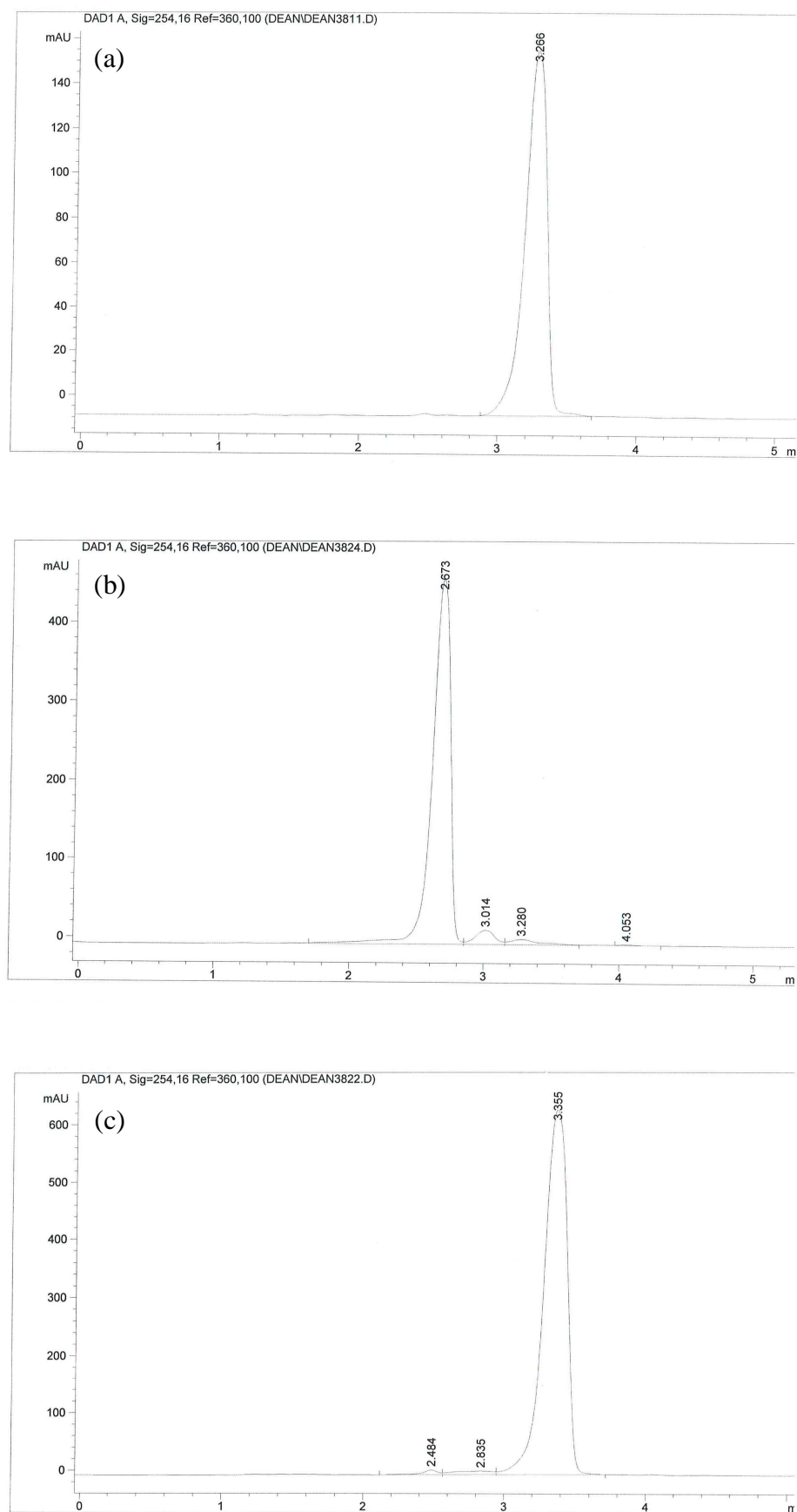
Slika P-7.6. Hromatogrami jedinjenja (a) **III.1** i (b) **III.3** u pokretnoj fazi *metanol-voda* 6:4, V/V



Slika P–7.7. Hromatogrami jedinjenja (a) **IV.1** i (b) **IV.4** u pokretnoj fazi *metanol-voda* 6:4, V/V

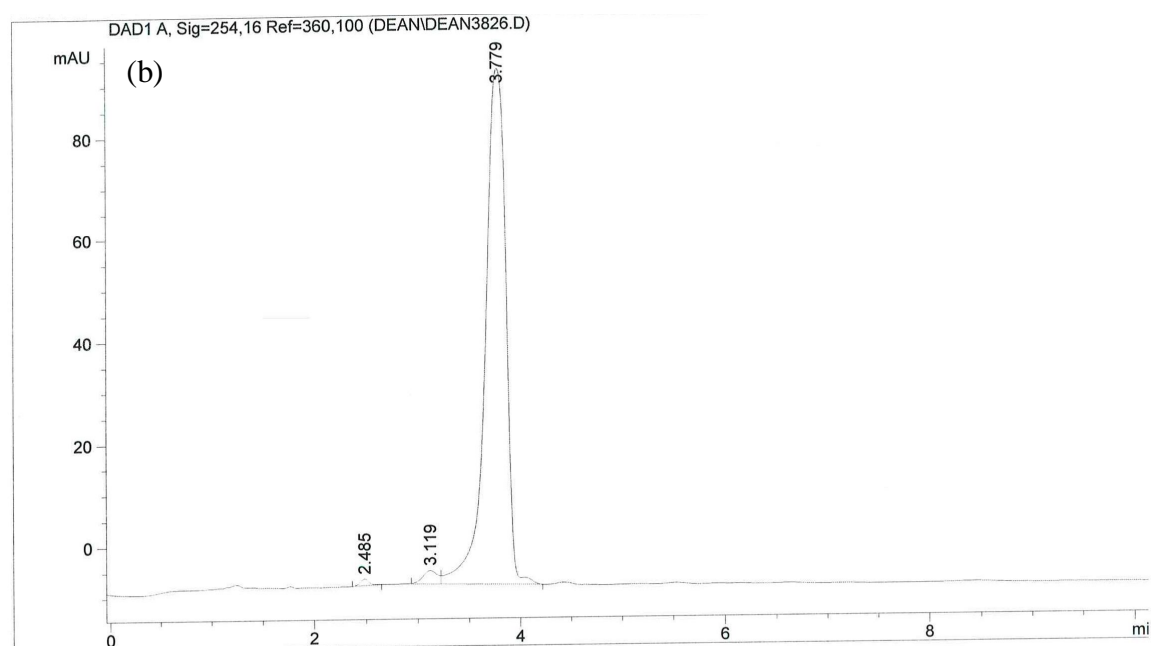
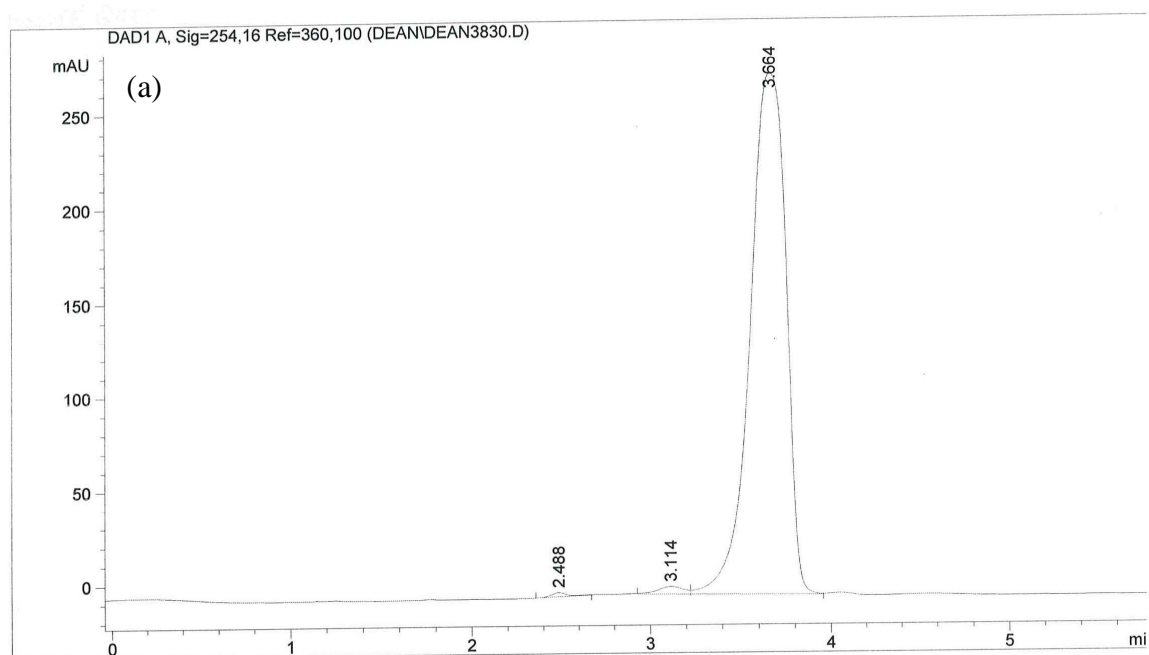


Slika P-7.8. Hromatogrami jedinjenja (a) **I.1** i (b) **I.2** u pokretnoj fazi acetonitril-voda 6:4, V/V



Slika P–7.9. Hromatogrami jedinjenja (a) **II.5**, (b) **II.6** i (c) **II.7** u pokretnoj fazi acetonitril-voda 6:4, V/V





Slika P-7.10. Hromatogrami jedinjenja (a) **III.3** i (b) **IV.4** u pokretnoj fazi *acetonitril-voda* 6:4, V/V

## BIOGRAFIJA

Davor Lončar je rođen 1981. godine u Novom Sadu. Osnovnu školu i Prirodno-matematički smer u gimnaziji „Isidora Sekulić“ u Novom Sadu završio je 2000. godine. Integrisane akademske studije u trajanju od 5 godina završio je 2007. godine na Tehnološkom fakultetu Novi Sad Univerziteta u Novom Sadu na studijskom programu Inženjerstvo ugljeno-hidratne hrane i stekao titulu dipl. inž. tehnologije.

Nakon diplomiranja od aprila 2007. godine radio je u nekoliko radnih organizacija kao viši analitičar i rukovodilac laboratorije. Sada je zaposlen kao rukovodilac Laboratorije za kontrolu kvaliteta Instituta Superlab u SUPERLAB d.o.o. u Beogradu.

Tokom rada bio je učesnik i organizator više seminara i radionica u zemlji i inostranstvu koje su bile vezane za određivanje rezidua pesticida, antibiotika i mikotoksina u hrani i životnoj sredini kao i obuka za rad sa najsavremenijim analitičkim instrumentima i za procenu merne nesigurnosti rutinskih analitičkih metoda. Ispit za savetnika za hemikalije položio je 2013. godine na Tehnološkom fakultetu Novi Sad.

Koautor je 8 naučnih publikacija.